



N° d'ordre



Thèse de doctorat

Discipline : Chimie/Biotechnologie

En co-tutelle entre

L'UNIVERSITE DU LITTORAL – COTE D'OPALE

et

L'UNIVERSITE LIBANAISE

Préparation, caractérisation physicochimique et évaluation des propriétés biologiques de complexes d'inclusion à base de cyclodextrines : applications à des principes actifs de type phénylpropanoïdes.

Présentée par :

Miriana KFOURY

Le 6 Novembre 2015

Membres du Jury :

Mme V. Bonnet, Université de Picardie Jules Verne, Rapporteur.

M. A. Abdel-Shafi, Ain Shams University, Rapporteur.

M. D. Patra, Université Américaine de Beyrouth, Examineur.

Mme L. Auezova, Université Libanaise, Co-encadrante de thèse

Mme H. Greige-Gerges, Université Libanaise, Directrice de thèse.

Mme S. Fourmentin, Université du Littoral Côte d'Opale, Directrice de thèse.

M. Y. Bakkour, Université Libanaise, Invité.

A mon fiancé, Nicolas

A mon père, Joseph

A ma mère, Nidale

A mes sœurs, Jessica et Santa

A mon frère, Toufic

« Une alimentation optimale est la médecine de demain »

Linus PAULING (1901-1994)

REMERCIEMENTS

Mes sincères remerciements et mon profond respect vont principalement à mes directrices de thèse, les Professeurs Sophie Fourmentin-Lamotte, Hélène Greige-Gerges et Lizette Auezova, pour m'avoir fait gagner en confiance, pour leur encadrement ainsi que leur disponibilité et grande gentillesse. Je souhaite remercier la Professeur Sophie Fourmentin-Lamotte d'avoir accepté de m'accueillir dans son équipe ce qui a développé une collaboration qui s'est avérée très fructueuse et qui, j'espère, continuera. Merci pour votre soutien et votre bonne humeur.

Je remercie également le Professeur David Landy pour toute son aide, ses qualités professionnelles et humaines et ses conseils qui m'ont éclairé durant ces années de thèse.

Toute ma reconnaissance envers le Mme V. Bonnet, M. A. Abdel-Shafi, M. Y. Bakkour et M. D. Patra pour m'avoir fait l'honneur d'être membre du jury de ma thèse.

Je tiens à remercier le Pr. Anissa Hadj-Sahraoui de m'avoir accueillie au sein de l'équipe IPCR. Je remercie également Natacha, Frédéric et Benoit pour leur aide, disponibilité et bonne ambiance.

Merci également au Dr. Amal Najjar pour son aide dans la réalisation des études de microbiologie bactérienne.

Je souhaite exprimer mes remerciements à l'ingénieur d'étude au sein de l'équipe chimie supramoléculaire Steven Ruellan pour l'aide qu'il m'a apportée dans les études RMN.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à l'ensemble des membres du CCM pour l'utilisation des diverses techniques au sein de leur laboratoire.

Je remercie enfin tous les collègues et amis qui m'ont soutenue dans le cadre de cette thèse.

Toute mon amitié

Lexique

4CL : 4-coumarate : CoA ligase
A : aire du pic chromatographique
AA% : activité antioxydante ou anti-radicalaire
ABTS : acide 2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique
ADN : acide désoxyribonucléique
AFNOR : association française de normalisation
AIS : anol/isoeugénol synthase
ARN : acide ribonucléique
AVF : augmentation du volume de formulation
BHA : butylhydroxyanisole
BHT : butylhydroxytoluène
C3H : acide *p*-coumarique 3-hydroxylase
C4H : cinnamate 4-hydroxylase
CAAT : coniféryle alcool acétyltransférase
CAD : cinnamylique déshydrogénase
CCR : cinnamoyl CoA réductase
CD: cyclodextrine
CE : efficacité de complexation
COMT : caféique *O*-méthyltransférase
CRYSMEB : β -cyclodextrine méthylée en face secondaire
CVOMT : chavicol *O*-méthyltransférase
DMAPP : diméthylallyl-diphosphate
DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle ; α,α -diphényl- β -picrylhydrazyle
DRX : diffraction des rayons X
DS : degré de substitution moyen par cyclodextrine
DSC : calorimétrie différentielle à balayage
E : énergie de complexation
EE% : efficacité d'encapsulation
EGS : eugénol synthase
EOMT : eugénol *O*-méthyltransférase
FDA : agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (U.S. food and drug administration)
FTIR : spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
GC : chromatographie en phase gazeuse
GRAS: generally recognized as safe
Hc : constante de Henry
HE : huile essentielle
HP- β -CD : hydroxypropyl- β -cyclodextrine
HR% : humidité relative
HS : espace de tête (headspace)
I : invité

IC₁₀₀ : concentrations du composé nécessaires pour inhiber la croissance ou la germination microbienne de 100 %
IC₅₀ : concentrations du composé nécessaires pour inhiber la croissance ou la germination microbienne de 50 %
IPP : isopentényl-diphosphate
ISO : organisation internationale de standardisation (international organization for standarization)
K_f : constante de stabilité ou de formation
LDH : enzyme lactico-déshydrogénase
MHE : extraction multiple par espace de tête
MO : orange de méthyle
NADPH : nicotinamide adenine dinucléotide phosphate
NF-κB : nuclear factor-kappa B
PA : principe actif
PAL : phénylalanine ammonia lyase
PBS : tampon phosphate salin
PM : matière particulaire « Particulate Matter »
PP : phénylpropanoïde
r% : pourcentage de rétention
RAMEB : β-cyclodextrine méthylée aléatoirement
RMN : résonance magnétique nucléaire
ROS : radicaux libres de l'oxygène
S₀ : solubilité aqueuse intrinsèque
SAM : S-adenosyl-L-méthionine
SC₅₀ : concentration nécessaire du composé pour réduire la concentration du radical de 50 %
T : constante de vitesse de dégradation
T1 : temps de relaxation
TAL : tyrosine ammonia lyase
TEAC : concentration équivalente de Trolox pour piéger 50 % de la quantité du radical
δ : déplacement chimique
V : constante de vitesse de libération

Résumé

Les phénylpropanoïdes (PPs) constituent l'une des familles les plus abondantes des métabolites secondaires dans le règne végétal. Ils protègent les plantes contre les stress biotiques et abiotiques. De nos jours, les études portent sur l'utilisation des PPs comme alternatifs aux agents antimicrobiens, antioxydants et anti-inflammatoires de synthèse pour leur incorporation dans la formulation des produits alimentaires et pharmaceutiques. Cependant, l'utilisation de PPs est généralement limitée en raison de leur faible solubilité, stabilité et volatilité. L'objectif de notre travail a été d'encapsuler sept PPs dans des molécules cages, les cyclodextrines (CDs), en vue de développer des systèmes naturels et éco-compatibles ayant des applications potentielles dans les domaines alimentaire et pharmaceutique. Trois axes ont été abordés. Le premier axe a porté sur la préparation et la caractérisation des complexes d'inclusion CD/PP en solution et à l'état solide. Les techniques d'«headspace» couplé à la chromatographie en phase gazeuse (HS-CG), spectropscopie UV-visible, ^1H RMN, (2D) ROESY RMN, FTIR, DSC et de la modélisation moléculaire ont été utilisées comme outils pour la caractérisation des complexes obtenus. Des études de phase de solubilité ont été également réalisées. Le deuxième axe a porté sur l'évaluation de l'effet des CDs sur la photostabilité et la vitesse de libération des PPs. Le dernier axe a été orienté vers l'étude des activités anti-radicalaire, antibactérienne et antifongique des complexes d'inclusion CD/PP. Les résultats montrent que les CDs sont capables d'encapsuler les PPs étudiés, réduire leur volatilité, augmenter leur solubilité et photostabilité ainsi que de générer des systèmes de libération prolongée. De plus, l'encapsulation conserve les propriétés antioxydante, antibactérienne et antifongique des PPs. Les résultats de cette étude suggèrent que les complexes d'inclusion des PPs avec les CDs peuvent être considérés comme outils prometteurs pour l'optimisation des formulations alimentaires et pharmaceutiques.

Mots clés: *Cyclodextrines, phénylpropanoïdes, constante de formation, stabilité, libération, antioxydant, antibactérien, antifongique.*

Abstract

Phenylpropanoids (PPs) are one of the largest families of plants secondary metabolites. They protect plants against biotic and abiotic stresses. Nowadays, extensive research has been dedicated to PPs aiming their use as natural alternatives to synthetic antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory agents in food and pharmaceutical formulations. However, PPs suffer from a low water solubility, high volatility, high light and thermal sensitivity that limit their further use. This current study aimed to encapsulate seven PPs in host cage molecules, cyclodextrins (CDs), in order to develop natural and biocompatible formulations that may find applications in food and pharmaceutical fields. It focused on three main research axes. The first part dealt with the preparation and the characterization of CD/PP inclusion complexes both in solution and in solid state. Characterizations were performed with Static-Headspace-Gas Chromatography (SH-GC), UV-Visible, ^1H NMR, (2D) ROESY NMR, FTIR, DSC and molecular modeling. These investigations were complemented with phase solubility studies. The second part was devoted to the evaluation of the effect of CDs on the PPs photostability and controlled release. The last part aimed to evaluate the CD/PP inclusion complexes as radical scavengers, antibacterial and antifungal agents. Results showed that CDs could successfully encapsulate PPs, reduce their volatility, enhance their solubility and photostability and generate controlled release systems. In addition, encapsulation maintained the antioxidant, antibacterial and antifungal properties of PPs. Thus, the CD/PP inclusion complexes could be considered as a promising tool for formulation optimization.

Keywords: *Cyclodextrins, phenylpropanoids, formation constant, stability, release, antioxidant, antibacterial, antifungal.*

Introduction générale	1
Partie 1. Etude bibliographique	
Chapitre I. Les huiles essentielles	4
I.1. Définition	4
I.2. Biosynthèse des phénylpropanoïdes	5
I.3. Obtention des huiles essentielles	9
I.3.1. Extraction à partir d'un matériel naturel	9
I.3.2. Synthèse chimique	10
I.3.3. Bioconversion ou biosynthèse	11
I.4. Caractéristiques physicochimiques	11
I.5. Stabilité des huiles essentielles	12
I.5.1. Effet de la lumière	13
I.5.2. Effet de la température	14
I.5.3. Effet de l'oxygène	14
I.5.4. Effet des contaminants	14
I.6. Propriétés biologiques	15
I.6.1. Activité antibactérienne	15
I.6.2. Activité antifongique	19
I.6.3. Activité antioxydante	22
I.6.4. Activité anti-inflammatoire	23
I.7. Utilisations	25
I.7.1. Domaine pharmaceutique	25
I.7.1.1. Législation	25
I.7.1.2. Utilisation	26
I.7.2. Domaine agro-alimentaire	27
I.7.3. Domaine cosmétique	28
Chapitre II. Les cyclodextrines	30
II.1. Vectorisation et chimie supramoléculaire	30
II.2. Historique des cyclodextrines	31
II.2.1. La découverte	31
II.2.2. L'exploration	33
II.2.3. Utilisation et application	33
II.3. Caractéristiques physicochimiques des cyclodextrines	34
II.4. Dérivés des cyclodextrines	36
II.4.1. Les dérivés méthylés	37
II.4.2. Les dérivés hydroxypropylés	37
II.4.3. Les dérivés sulfobutylés	37
II.4.4. Caractéristiques générales des dérivés de cyclodextrines	38
II.5. Propriétés complexantes des cyclodextrines	38
II.5.1. Formation du complexe d'inclusion	38
II.6. Les techniques de préparation des complexes d'inclusion CD/invité	40
II.6.1. L'inclusion par cristallisation de la solution (co-précipitation)	40

II.6.2. L'inclusion par co-mélange (<i>co-grinding</i>).....	41
II.6.2.1. L'inclusion en suspension (<i>slurry</i>).....	41
II.6.2.2. L'inclusion par pétrissage (<i>paste/kneading</i>)	41
II.6.2.3. L'inclusion en méthode humide (<i>damp</i>)	41
II.6.3. L'inclusion par extrusion	42
II.6.4. L'inclusion à sec	42
II.6.5. L'inclusion par neutralisation	42
II.6.6. L'inclusion par co-évaporation	42
II.6.7. Séchage par atomisation/ pulvérisation (<i>spray drying</i>)	42
II.6.8. Séchage par lyophilisation (<i>freeze drying</i>)	43
II.6.9. L'inclusion au CO ₂ supercritique.....	43
II.6.10. L'inclusion par microondes	43
II.6.11. Effets de la technique de préparation des complexes d'inclusion	43
II.7. Caractérisation des complexes en solution.....	45
II.7.1. Les constantes de formation (K_f)	45
II.7.1.1. L'espace de tête couplé à la chromatographie en phase gazeuse	46
II.7.1.2. La spectroscopie UV-Visible et la méthode par compétition	46
II.7.1.3. Le diagramme de solubilité.....	47
II.7.2. les paramètres thermodynamiques	50
II.7.3. La géométrie et la structure du complexe	50
II.8. Caractérisation des complexes à l'état solide.....	51
II.8.1. La calorimétrie différentielle à balayage (DSC).....	51
II.8.2. La spectroscopie à transformée de Fourier (FTIR).....	51
II.8.3. La diffraction des rayons X (DRX)	52
II.8.4. La multiple extraction	52
II.9. Modélisation moléculaire.....	53
II.10. Toxicité et métabolisme des cyclodextrines.....	54
II.10.1. L' α -cyclodextrine.....	55
II.10.2. La β -cyclodextrine.....	55
II.10.3. La γ -cyclodextrine	55
II.10.4. Les cyclodextrines méthylées.....	56
II.10.5. L'hydroxypropyle- β -cyclodextrine	56
II.10.6. La sulfobutyléther- β -cyclodextrine.....	57
II.11. Interactions des cyclodextrines avec les membranes	57
II.12. Mécanismes de libération de l'invité du complexe d'inclusion.....	59
II.12.1. La dilution.....	59
II.12.2. Le déplacement de l'invité par compétition	60
II.12.3. La liaison aux protéines plasmatiques	60
II.12.4. L'absorption du PA par les tissus	60
II.12.5. Le changement d'un paramètre physico-chimique	61
II.12.5.1. Le changement de la température.....	61
II.12.5.2. Le changement de pH et de la force ionique	61
II.13. Utilisation des cyclodextrines	61

II.13.1. Domaine pharmaceutique.....	62
II.13.2. Domaine agroalimentaire	63
II.13.3. Domaine cosmétique.....	64
II.13.4. Domaine du textile	65
II.13.5. Domaine de l'environnement.....	65
II.14. Complexation des huiles essentielles par les cyclodextrines	65
II.14.1. Augmentation de la solubilité	66
II.14.2. Augmentation de la stabilité.....	67
II.14.3. Réduction de la volatilité.....	67
II.14.4. Diminution des effets indésirables	67
II.14.5. Transformation d'un liquide en poudre.....	68
II.14.6. L'amélioration des activités biologiques.....	68
II.14.7. Libération contrôlée	69
II.15. Conclusion.....	70
Stratégie de travail.....	71
Partie 2. Etude du phénomène d'inclusion	
Chapitre III. Caractérisation des complexes d'inclusion en solution	75
III.1. Détermination de la constante de Henry (H_c).....	77
III.1.1. Méthodologie	77
III.1.2. Résultats et discussion	79
III.2. Détermination de la capacité de rétention des CDs (r^0)	80
III.2.1. Méthodologie	80
III.2.2. Résultats et discussion	81
III.3. Détermination des constantes de formation (K_f)	82
III.3.1. Détermination des constantes de formation (K_f) par HS-GC	82
III.3.1.1. Méthodologie	82
III.3.1.1.1. Méthode classique.....	82
III.3.1.1.2. Méthode rapide	83
III.3.1.2. Traitement algorithmique	84
III.3.1.3. Résultats et discussion	86
III.3.2. Détermination des constantes de formation par UV-Visible.....	88
III.3.2.1. Méthodologie	88
III.3.2.2. Traitement algorithmique	91
III.3.2.3. Résultats et discussion	93
III.4. Etude de phase de solubilité	96
III.4.1. Méthodologie.....	97
III.4.2. Résultats et discussion.....	97
III.5. Résonance Magnétique Nucléaire (RMN).....	104
III.5.1. Méthodologie.....	104
III.5.2. Résultats et discussion.....	104
III.5.3. RMN 2D ROESY	108

III.6. Conclusion	109
Chapitre IV. Caractérisation des complexes d'inclusion solides	110
IV.1. Préparation des complexes CD/PP à l'état solide	111
IV.2. Préparation des mélanges physiques CD/PP	111
IV.3. Détermination de la teneur en PP et de l'efficacité d'encapsulation	111
IV.3.1. UV-Visible	112
IV.3.2. Extraction multiple par espace de tête	112
IV.3.3. Résultats et discussion.....	114
IV.3.3.1. Spectroscopie UV-Visible	114
IV.3.3.1.1. Effet du rapport équimolaire	114
IV.3.3.1.2. Influence des différents rapports molaires	116
IV.3.3.2. Extraction multiple par espace de tête (MHE)	118
IV.4. Etude par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)	120
IV.4.1. Méthodologie	120
IV.4.2. Résultats et discussion.....	120
IV.5. Etude par calorimétrie différentielle à balayage (DSC)	122
IV.5.1. Méthodologie	122
IV.5.2. Résultats et discussion.....	122
IV.6. Conclusion	125
Chapitre V. Modélisation moléculaire	126
V.1. Méthodologie	126
V.2. Résultats et discussion	129
V.3. Conclusion	133
Partie 3. Effets de l'encapsulation sur les propriétés des PPs	
Chapitre VI. Effets de l'encapsulation sur les caractéristiques physicochimiques des PPs.	134
VI.1. Expériences de photodégradation	135
VI.1.1. Méthodologie	135
VI.1.2. Résultats et discussion.....	136
VI.2. Etudes de libération par volatilisation à température ambiante	141
VI.2.1. Méthodologie	141
VI.2.2. Résultats et discussion.....	142
VI.3. Etudes de libération à 100°C	144
VI.3.1. Méthodologie	144
VI.3.2. Résultats et discussion.....	145
VI.4. Effet de l'humidité relative du milieu	146
VI.4.1. Méthodologie	146
VI.4.2. Résultats et discussion.....	147
VI.5. Conclusion	148

Chapitre VII. Effets de l'encapsulation sur les caractéristiques biologiques des PP.....	150
VII.1. Etudes de l'activité antioxydante.....	152
VII.1.1. Piégeage du radical libre DPPH •	152
VII.1.1.1. Principe.....	152
VII.1.1.2. Méthodologie.....	152
VII.1.1.3. Résultats et discussion.....	154
VII.1.2. Piégeage du radical cation ABTS+•	157
VII.1.2.1. Principe.....	157
VII.1.2.2. Méthodologie.....	159
VII.1.2.3. Résultats et discussion.....	159
VII.2. Etude de l'activité antifongique des PP à l'état libre ou encapsulé	163
VII.2.1. Les microorganismes	164
VII.2.1.1. Fusarium oxysporum.....	164
VII.2.1.2. Botrytis cinerea.....	165
VII.2.2. Procédure microbiologique.....	165
VII.2.2.1. Test d'inhibition de la croissance mycélienne	165
VII.2.2.1. Test d'inhibition de la germination des conidies.....	166
VII.2.3. Résultats et discussion	167
VII.2.3.1. Test d'inhibition de la croissance mycélienne	167
VII.2.3.2. Test d'inhibition de la germination des spores.....	172
VII.3. Etude de l'activité antibactérienne des PP libres ou encapsulés	175
VII.3.1. Escherichia coli.....	175
VII.3.2. Procédure microbiologique.....	177
VII.3.2.1. Technique de macrodilution en milieu liquide.....	177
VII.3.3. Résultats et discussion	178
VII.3.3.1. Test d'inhibition de la croissance bactérienne	178
VII.4. Conclusion	182
Conclusion générale et perspectives	184
Liste des travaux	187
Références bibliographiques	

Introduction

Les huiles essentielles (HEs) et leurs composants tels que les phénylpropanoïdes (PPs) étudiés dans ce travail (*trans*-anéthol, estragole, eugénol, isoeugénol, acide caféique, acide férulique et acide *p*-coumarique), étaient et sont toujours aux services de l'alimentation, la santé et la beauté de l'homme ce qui leur confère une omniprésence dans notre vie quotidienne. Cela est dû à leur large palette de propriétés biologiques telles que les effets antioxydants, antibactériens, antifongiques, modulateurs de la réaction inflammatoire, etc. (Boulogne *et al*, 2012 ; da Silveira E Sa *et al*, 2014 ; Miguel, 2010 ; Nazzarro *et al*, 2013). Ces activités en font des alternatives naturelles et éco-compatibles aux conservateurs, biocides et antioxydants de synthèse.

Toutefois, les PPs souffrent d'une très faible solubilité dans les phases aqueuses ; de plus ces composés sont volatiles et sensibles aux agressions du milieu extérieur. Ces inconvénients peuvent être contournés par l'encapsulation des PPs dans les cyclodextrines (CDs). Les CDs sont des oligosaccharides cycliques obtenus par dégradation enzymatique de l'amidon. Elles possèdent la structure d'un cône tronqué ayant une cavité interne hydrophobe et une surface externe hydrophile. Ceci leur confère la propriété de former des complexes d'inclusion (hôte/invité) avec une variété de composés organiques ou inorganiques (Szejtli, 2004). L'intérêt majeur de l'encapsulation par les CDs est d'améliorer la solubilité aqueuse et la biodisponibilité des invités, les protéger contre le milieu extérieur, diminuer leur volatilité et constituer des systèmes de libération prolongée et contrôlée. La formation des complexes d'inclusion CD/PP permet, par conséquent, de réduire les pertes par dégradation et évaporation et de diminuer les concentrations appliquées.

Il faut noter que les PPs et les CDs sont des produits naturels. Par conséquent les complexes d'inclusion CD/PP peuvent être appliqués en toute innocuité dans les domaines pharmaceutique, environnementale et agroalimentaire.

Cette étude vise à examiner la capacité des CDs à encapsuler et mettre en œuvre des systèmes de protection, de stockage et de libération prolongée et contrôlée des PPs en solution comme à l'état solide. Les complexes d'inclusion sont des produits à forte valeur ajoutée, dont la préparation optimale est délicate à maîtriser. Dans ce contexte, il est donc indispensable d'étudier les interactions entre les CDs et les PPs afin de mieux connaître et comprendre le procédé d'encapsulation ainsi que les facteurs impliqués dans le processus d'inclusion. L'optimisation des conditions de préparation des complexes d'inclusion en solution ou à l'état solide permet d'améliorer les fonctionnalités de solubilisation, de protection et de relargage apportées par les CDs. Ainsi nous attachons un intérêt tout particulier à la caractérisation des complexes d'inclusion par un large éventail de techniques expérimentales et théoriques. Tout cela dans l'objectif de trouver les facteurs qui conditionnent la stabilité des liaisons entre les CDs et les PPs ainsi que les effets désirés de l'encapsulation. L'ensemble des résultats nous permet d'acquérir par conséquent des connaissances fondamentales sur les mécanismes d'interaction et d'assemblage des composants du complexe d'inclusion et de trouver la recette optimale pour répondre le mieux possible aux effets espérés de l'encapsulation. Après avoir compris et optimisé le procédé d'encapsulation, nous allons par la suite étudier l'effet des CDs sur les différentes propriétés physico-chimiques et biologiques des PPs.

Ce manuscrit s'articule en trois grandes parties constituées de sept chapitres :

La **première partie** de ce manuscrit offre une synthèse bibliographique sur les HEs, dont les PPs constituent une classe importante, faisant ainsi l'objet du **premier chapitre** de cette partie et les CDs en font le **deuxième chapitre**. Cette partie présente également un aperçu sur l'intérêt de l'utilisation des CDs pour l'encapsulation moléculaire des HEs ou de leurs constituants.

La préparation et la caractérisation des complexes d'inclusion en solution et en phase solide sont décrites dans la **deuxième partie**. Le **troisième chapitre** de cette thèse présente l'étude des complexes d'inclusion en solution. La caractérisation quantitative est effectuée par la technique de l' "headspace" couplée à la chromatographie en phase gaz, par spectrophotométrie UV-

Visible et par les études de phase de solubilité. L'utilisation de différentes approches analytiques nous permet d'effectuer une comparaison multi-techniques et de déterminer différents paramètres caractéristiques des complexes d'inclusion. La caractérisation structurale des complexes d'inclusion est également étudiée par spectroscopie RMN. Le **quatrième chapitre** a trait à la préparation et la caractérisation des complexes d'inclusion à l'état solide. Il vise à vérifier la réalité de l'inclusion dans les complexes solides, déterminer le rendement d'encapsulation et optimiser le procédé de préparation. La modélisation moléculaire fait l'objet du **cinquième chapitre**. Cette étude permet de conforter les résultats expérimentaux et obtenir des informations sur les énergies et les mécanismes qui régissent le processus d'encapsulation.

La **troisième partie** s'intéresse à suivre le comportement des PPs dans leurs complexes d'inclusion et à déterminer l'effet des CDs sur les caractéristiques physico-chimiques et biologiques des molécules encapsulées. Le **sixième chapitre** vise à comprendre l'impact de l'encapsulation sur la stabilité et le relargage des PPs. Une comparaison des cinétiques de dégradation et de libération des PPs libres ou encapsulés en solution et dans des complexes d'inclusion solides dans différentes conditions est menée. Le **septième chapitre** est consacré à l'évaluation, *in vitro*, des activités antioxydante, antifongique et antibactérienne des PPs et de leurs complexes d'inclusion.

Cette thèse a fait l'objet d'une convention de cotutelle entre l'Université Libanaise (Ecole Doctorale des Sciences et de Technologie, EDST), Liban et l'Université du Littoral Côte d'Opale (Unité de Chimie Environnementale et Interactions sur le Vivant, UCEIV), France.

Partie 1. Etude bibliographique

Chapitre I. Les huiles essentielles

I.1. Définition

De nos jours, les HEs sont définies et connues comme suit : (ISO 9235, 1997; Pharmacopée européenne : HEs - Aetherolea 01/2008 :2098):

« Produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, soit par un procédé mécanique approprié sans chauffage. L'HE est le plus souvent séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif de sa composition ». L'ISO (International Organization for Standardization) réserve le terme « *huile essentielle* » pour tout produit obtenu d'une matière végétale ou d'un fruit par distillation ou simple processus mécanique (ISO 9235, 1997).

La liste 2012 des plantes médicinales de la Pharmacopée française comprend 365 plantes médicinales publiées dans la liste A (liste des plantes médicinales utilisées traditionnellement) au lieu des 332 de la liste A révisée en 2005.

L'utilisation des HEs est en pleine croissance jusqu'à devenir depuis plus d'une vingtaine d'années, une sérieuse alternative aux agents antimicrobiens et constituer la médecine dite alternative. De nos jours, la chimie analytique et organique ont permis de purifier, identifier, caractériser, quantifier et synthétiser avec une grande exactitude plusieurs constituants des HEs. De nombreuses études traitent de l'activité antimicrobienne, antioxydante, anti-inflammatoire et anticancéreuse des HEs (Amorati *et al*, 2013 ; Bhalla *et al*, 2013 ; da Silveira E Sa *et al*, 2014 ; Miguel, 2010 ; Nazzaro *et al*, 2013 ; Pazyar *et al*, 2013 ; Saad *et al*, 2013 ; Seow *et al*, 2014). La Figure I.1 illustre quelques exemples de préparations pharmaceutiques contenant des HEs.

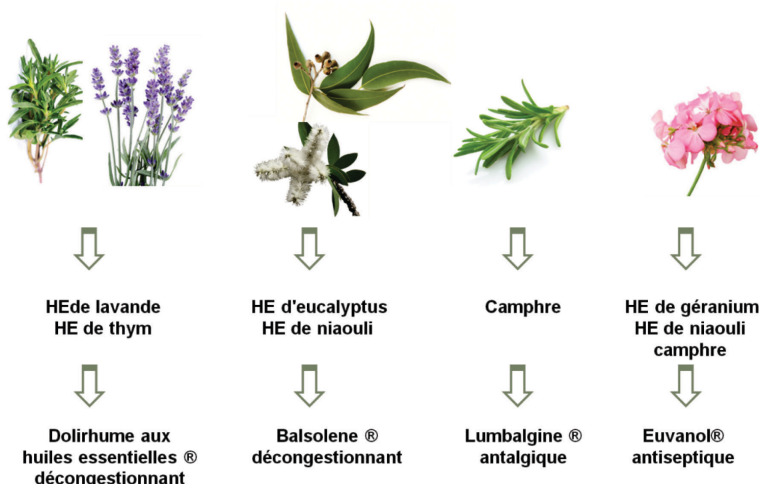


Figure I.1. Exemples de quelques préparations pharmaceutiques contenant des huiles essentielles.

I.2. Biosynthèse des phénylpropanoïdes

Les HEs sont des métabolites secondaires constitués principalement de terpénoïdes et de phénylpropanoïdes (PPs) de faible poids moléculaire.

Les PPs sont synthétisés à partir de la phénylalanine obtenue par la voie de l'acide shikimique (Gray *et al*, 2012) tandis que les terpénoïdes sont produits par la condensation des unités d'isopentényl-diphosphate (IPP) ou de diméthylallyl-diphosphate (DMAPP) issus de la voie de l'acide mévalonique ou son alternative non-mévalonique, la voie du méthylérythritol phosphate (Figure I.2). L'IPP et le DMAPP sont deux isomères constituant la forme biologiquement active de la molécule isoprénique (C5) (Berthelot *et al*, 2012). Dans ce mémoire nous détaillerons uniquement la voie de synthèse des PPs.

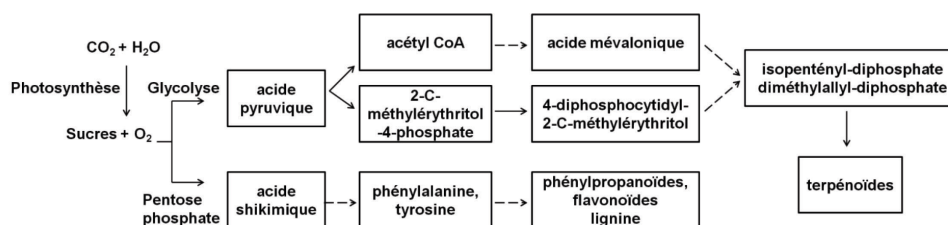


Figure I.2. Principales voies de biosynthèse des terpénoïdes et des polyphénols chez les plantes.

Les PPs sont largement répandus dans le monde végétal. Ils sont subdivisés en un certain nombre de sous-classes. Parmi ces derniers nous pouvons citer les phenylpropenes et les acides

hydroxycinnamiques. La Figure I.3 montre des exemples d'espèces végétales, riches en phénylpropènes et en acides hydroxycinnamiques, consommées dans notre vie courante.

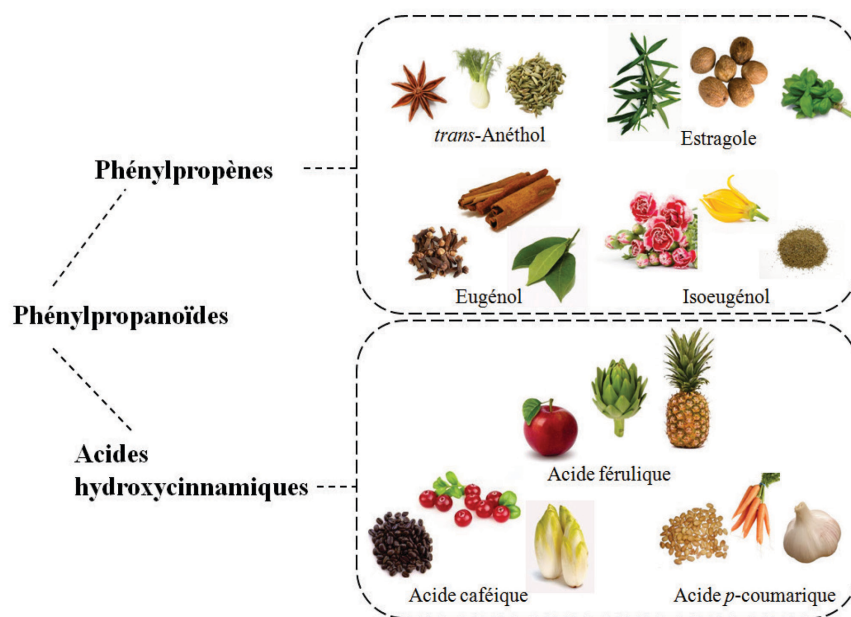


Figure I.3. Exemples d'espèces végétales riches en phénylpropènes et acides hydroxycinnamiques.

Les PPs dérivent tous de l'acide *trans*-cinnamique (Figure I.4). C'est le premier phénylpropène obtenu par désamination non oxydative de la phénylalanine sous l'action de la phénylalanine ammonia lyase (PAL).

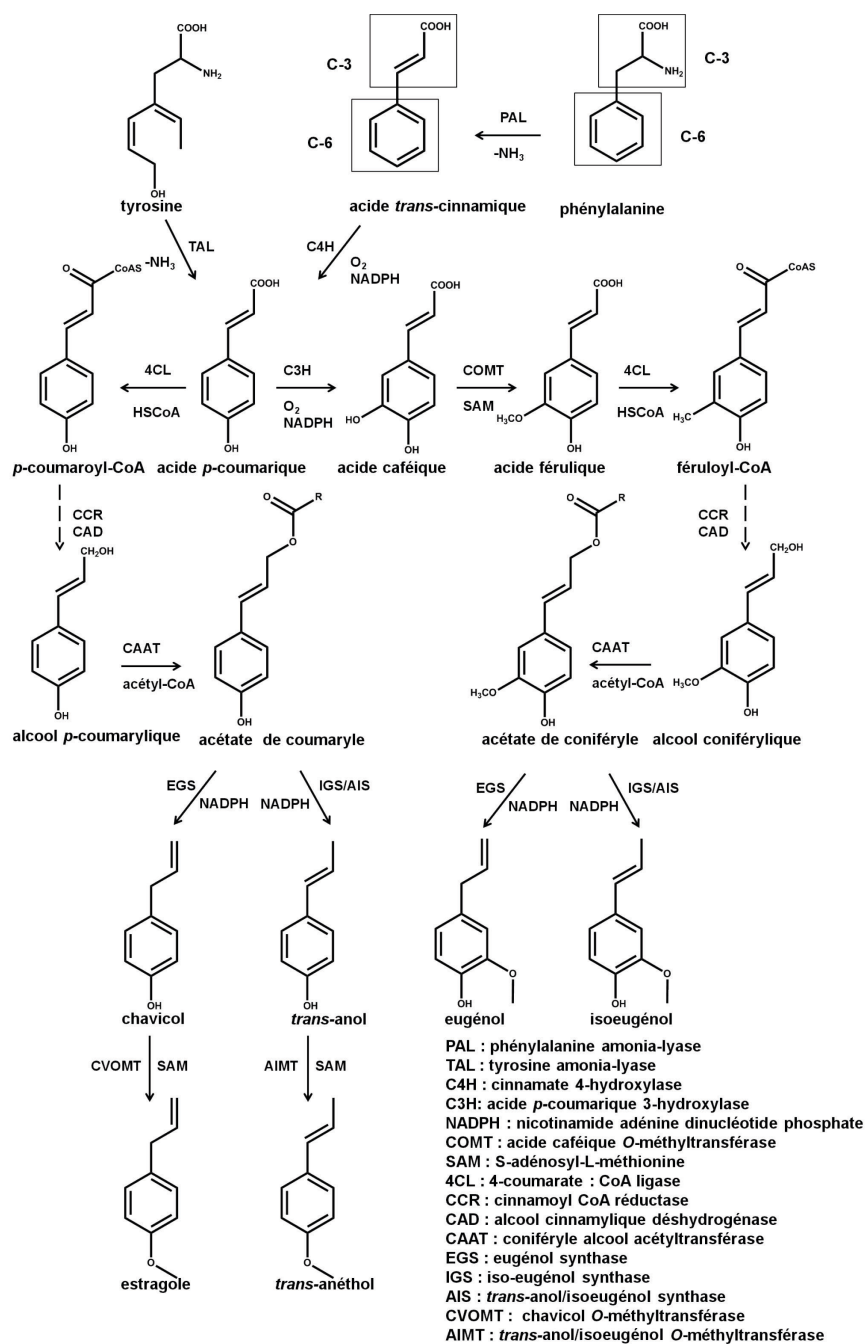


Figure I.4. Voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes.

De ce fait, l'ensemble des PP renferme un noyau aromatique et une chaîne latérale de trois carbones (C6-C3) issus du squelette carboné de la phénylalanine. La PAL peut également avoir une activité tyrosine ammonia lyase (TAL) qui, par désamination de la tyrosine (surtout chez les monocotylédones), permet d'obtenir directement l'acide *p*-coumarique (Figure I.4). Le fait que les deux voies coexistent chez une même espèce végétale n'est pas encore démontré. La PAL,

point d'entrée dans la biosynthèse des PP, constitue un lien avec le métabolisme primaire de l'acide shikimique (métabolisme conduisant à la formation des acides aminés aromatiques : phénylalanine, tyrosine et tryptophane). Une régulation coordonnée et régulée des étapes enzymatiques de cette voie est strictement exigée pour contrôler le flux de carbone entrant dans le métabolisme des PP par la PAL (Douglas, 1996 ; Ferrer *et al*, 2008).

L'acide *trans*-cinnamique est ensuite hydroxylé en position 4 par l'action de la cinnamate 4-hydroxylase (C4H). Cela aboutit à la formation de l'acide *p*-coumarique. La C4H est une mono-oxygénase appartenant à la famille des cytochromes P450 (Teutsch *et al*, 1993). L'acide *p*-coumarique 3-hydroxylase (C3H) réalise ensuite une étape d'hydroxylation en position 3 du noyau aromatique de l'acide *p*-coumarique pour donner l'acide caféique. L'acide caféique O-méthyltransférase (COMT) catalyse ultérieurement le transfert du groupement méthyle du cofacteur S-adenosyl-L-méthionine (SAM) (qui est ainsi converti en S-adenosyl-L-homocystéine (SAH)), sur l'hydroxyle en *méta* de l'acide caféique (Maury *et al*, 1999). L'acide férulique ainsi obtenu est classé, avec l'acide caféique et l'acide *p*-coumarique, parmi les acides hydroxycinnamiques. Les acides hydroxycinnamiques sont accumulés sous forme d'esters de CoA dans les parois de la plante (Meyer *et al*, 1991). C'est la 4-coumarate : CoA ligase (4CL) qui catalyse la formation ATP-dépendante d'esters de CoA. Cette ligase catalyse préférentiellement l'estérification des acides *p*-coumarique et férulique en *p*-coumaroyl-CoA et le féruloyl-CoA (Baucher *et al*, 1998). A partir des esters CoA, les monolignols (alcools *p*-hydroxycoumarylique et coniférylique) sont synthétisés. Deux enzymes interviennent dans leur synthèse : la cinnamoyl CoA réductase (CCR) et l'alcool cinnamylique déshydrogénase (CAD) en réduisant successivement les esters de CoA en aldéhydes puis en alcools.

Une enzyme intéressante dans la biosynthèse des PP est la coniféryle alcool acétyltransférase (CAAT) appartenant à la superfamille « BAHD ». Cette superfamille des acyltransférases dépendantes des esters de CoA a été nommée BAHD d'après ces 4 membres (BEAT : benzyle alcool O-acétyltransférase; AHCTs : anthocyanine O-hydroxycinnamoyltransférases; HCBT : anthranilate N-hydroxycinnamoyl/ benzoyltransférase ; DAT : déacétylvindoline 4-O-acétyltransférase) (Tuominen *et al*, 2011).

La CAAT active deux voies de synthèse des phénylpropènes (Figure I.4) en produisant l'acétate de coumaryle et l'acétate de coniféryle qui seront par la suite reconnus par des enzymes dépendantes du NADPH : l'eugénol synthase (EGS) et/ou l'anol/isoeugénol synthase (AIS).

Quatre phénylpropènes seront ainsi obtenus : l'eugénol, l'isoeugénol, le chavicol et le *trans*-anol. Ensuite, deux O-méthyltransférases ajoutent un groupement méthyle en position 4 du chavicol et du *trans*-anol pour donner l'estragole et le *trans*-anéthol, respectivement. Ce sont l'eugénol O-méthyltransférase (EOMT) et la chavicol O-méthyltransférase (CVOMT) (Koeduka *et al*, 2006).

I.3. Obtention des huiles essentielles

Les HEs et leurs composants sont extraits généralement d'un matériel naturel ou produites par synthèse chimique après caractérisation et élucidation de leur structure. La synthèse chimique prend une grande place dans la production des constituants des HEs. En effet, l'extraction à partir des plantes aromatiques aboutit à une HE complexe et le rendement de cette extraction est sujet à plusieurs contraintes comme la faible teneur en HE dans le matériel végétal, les variations climatiques, la nature du sol, la nutrition et les maladies de la plante. Cependant, la synthèse chimique aboutit généralement à des mélanges racémiques et à des produits nocifs pour l'environnement qui nécessite par conséquent une étape de purification et d'isolement des constituants purs. Ces inconvénients sont à la base de la naissance d'une nouvelle technologie de production des HEs naturelles par bioconversion ou biosynthèse. Il existe donc trois stratégies différentes pour l'obtention des HEs : l'extraction à partir d'un matériel naturel, la synthèse chimique et la bioconversion.

I.3.1. Extraction à partir d'un matériel naturel

Les principales techniques d'extraction des HEs sont : l'enfleurage, le pressage, l'hydrodistillation, l'entraînement à la vapeur sèche et l'extraction au dioxyde de carbone supercritique.

a) L'enfleurage : les pétales et les fleurs des plantes sont étalées sur des graisses permettant d'extraire leurs arômes. Une fois saturée la matière grasse est traitée par l'alcool. Cette technique est surtout employée pour les fleurs fraîches et fragiles (jasmin, tubéreuse, violette).

b) Le pressage : l'HE est extraite sous simple pression du matériel végétal. C'est par exemple le cas de l'HE de citron qui est extraite par pression à froid de l'écorce d'un citron frais.

c) L'hydrodistillation : c'est la technique d'extraction la plus ancienne (mise au point dès le IX^e siècle) et qui reste la plus utilisée. Elle consiste à distiller la matière végétale dans l'eau. La vapeur d'eau entraîne les constituants volatils qui seront condensés dans un réfrigérant. Le

distillat obtenu sera décanté puis traité. L'eau résiduelle peut contenir une faible proportion de certains composés volatils et peut être utilisée sous le terme d'eau florale.

d) L'entraînement à la vapeur sèche : ce procédé a été mis au point pour éviter certaines réactions de dégradation ou d'hydrolyse des composants de l'HE. La masse végétale repose sur une grille vers laquelle la vapeur sèche est pulsée. Les cellules se distendent et les molécules odorantes se libèrent et seront vaporisées et condensées dans un réfrigérant.

e) L'extraction au dioxyde de carbone (CO₂) supercritique : des appareils à l'échelle analytique, pilote ou industrielle permettent l'extraction en utilisant le CO₂ supercritique. Celui-ci présente l'avantage d'être un fluide ininflammable, non explosif, non toxique, non corrosif, inodore et inerte. Le fait d'opérer à une température faible critique du CO₂ (31,1 °C) permet d'extraire et sauvegarder les composants fragiles des HEs (lilas, muguet, etc.). Ce procédé est largement utilisé en industrie pharmaceutique permettant l'extraction des composés actifs (Santoyo *et al*, 2014).

I.3.2. Synthèse chimique

La composition d'HE est extrêmement complexe. Il est donc impossible de recréer l'équilibre naturel par une simple synthèse ou mélange de constituants. Toutefois, des composants d'HEs de synthèse sont largement utilisés car les besoins mondiaux en arômes et parfums agumentent et le coût d'extraction est élevé. De nos jours, il existe deux types d'arômes synthétiques : les arômes de synthèse identiques au naturel et les arômes artificiels n'existant pas dans la nature.

Les arômes de synthèse obtenus par voie purement chimique ont une structure et des propriétés identiques à ceux des arômes naturels. Prenons le cas du menthol et de la vanilline (Figure I.5) ; la demande de ces deux arômes excède largement la réserve en ressources naturelles. Le menthol se trouve naturellement dans l'HE de menthe poivrée et il peut être également synthétisé à partir d'une grande variété de molécules (Figure I.5 a) (Trasarti *et al*, 2013). La vanille peut quant à elle être extraite de la gousse de vanille mais également être obtenue par différentes voies de synthèse (Figure I.5 b) (Ververidis *et al*, 2007). Les arômes de synthèse n'existant pas dans la nature sont des arômes artificiels. Un groupement éthoxy peut ainsi remplacer le groupement méthoxy de la vanilline pour donner l'éthylvanilline (Figure I.5 b). Ce composé présente une odeur douze fois plus puissante que celle de la vanilline mais

n'existe pas, même à l'état de trace, dans la gousse de vanille. C'est un composé purement artificiel. C'est également l'exemple du fameux N° 5 de Chanel qui résulte de l'association à l'essence d'ylang-ylang de composés synthétiques (environ 80 ingrédients).

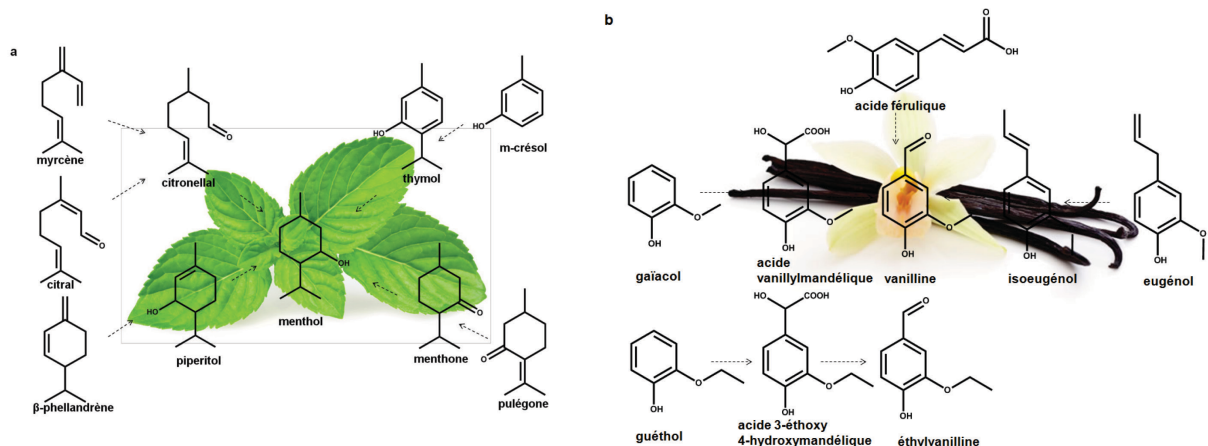


Figure I.5. Exemples de voies de synthèse de composants d'huiles essentielles : a) le menthol et b) la vanilline et l'éthylvanilline.

I.3.3. Bioconversion ou biosynthèse

Cette procédure est une alternative à la synthèse chimique classique pour une raison économique et environnementale principalement dans un contexte de développement durable. Elle consiste à transformer une matière première (précurseur) en utilisant des systèmes biologiques (microorganismes, plantes, enzymes). La mise sur le marché d'enzymes (> 400) régio- ou stéréo-sélectives permet l'obtention d'un composé pur, ce qui n'est pas le cas pour la synthèse chimique qui aboutit généralement à des mélanges racémiques (Kuriata-Adamusiak *et al*, 2012). La bioconversion/biosynthèse exige que le précurseur soit issu d'un végétal et obtenu par des procédés naturels et que les systèmes biologiques utilisés soient GRAS (*Generally Recognized As Safe*). Les molécules produites existent bien évidemment dans la nature et sont considérées comme naturelles.

I.4. Caractéristiques physicochimiques

Les HEs sont caractérisées par la propriété d'être liquides et volatiles à température ambiante. Elles sont souvent légèrement colorées avec une forte odeur. Leur densité est inférieure à celle de l'eau. Elles sont très peu solubles dans l'eau mais entraînables à sa vapeur. En revanche, les HEs sont solubles dans les solvants organiques usuels et dites donc liposolubles.

Cette lipophilicité leur confère une capacité majeure permettant leur diffusion dans l'organisme indépendamment de la voie d'administration. De plus, les HEs présentent un indice de réfraction qui varie principalement avec la teneur en monoterpènes et en dérivés oxygénés. Les HEs sont très sensibles à la dégradation. La susceptibilité des HEs sera évoquée plus en détails dans le paragraphe suivant. Un nombre important de composants d'HEs existe sous forme de couples d'énantiomères ou d'isomères (Kamatou *et al*, 2013). Certains possèdent des odeurs différentes (Figure I.6 a) alors que d'autres ont des odeurs proches et ne se distinguent que par leur seuil de perception (Figure I.6 b). Ceci révèle l'importance de leur structure tridimensionnelle.

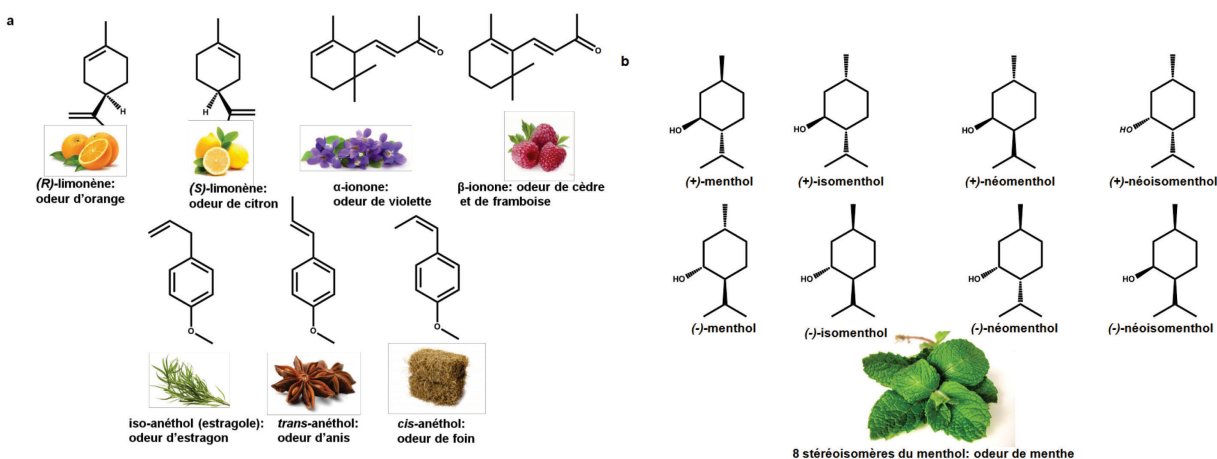


Figure I.6. Exemples de couples d'énantiomères et d'isomères des composants d'huiles essentielles présentant des odeurs a) différentes ou b) similaires.

I.5. Stabilité des huiles essentielles

Les HEs présentent une forte instabilité vis-à-vis de divers facteurs extrinsèques et intrinsèques (Figure I.7). L'éventuelle dégradation des HEs peut être facilement révélée par la mesure des indices chimiques (indice de peroxyde, indice d'acide, etc.), par la détermination de grandeurs physiques (indice de réfraction, pouvoir rotatoire, miscibilité à l'éthanol, densité, etc.) et par l'analyse chromatographique (Turek & Stintzing, 2013).

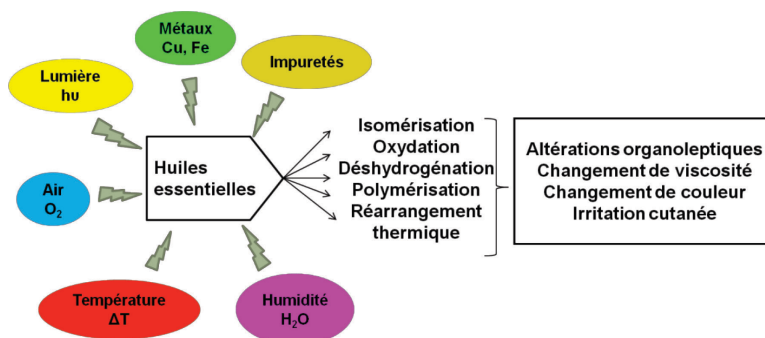


Figure I.7. Différentes voies de dégradation possibles des huiles essentielles.

La conservation des HEs exige des précautions particulières. Il convient ainsi d'utiliser de petits flacons en verres teintés ou opaques pour minimiser la présence d'air et les préserver à l'abri de la lumière, l'oxygène, l'humidité et les contaminants ainsi que pour réduire l'incompatibilité qui peut exister avec certains récipients en matières plastiques. Il existe des normes spécifiques pour l'emballage, le conditionnement et le stockage des HEs (norme AFNOR NF T 75-001, 1996) ainsi que pour le marquage des récipients les contenant (norme NF 75-002, 1996). Parmi les principales réactions de dégradation nous pouvons citer, entre autres, l'oxydation, l'isomérisation, la polymérisation, la racémisation, le réarrangement thermique, la volatilisation, etc. (Turek & Stintzing, 2013). En dehors de la perte ou de la modification de la structure, le problème de la dégradation subsiste dans l'altération des propriétés organoleptiques des HEs et la production de composés secondaires toxiques.

I.5.1. Effet de la lumière

Les HEs sont très sensibles à la lumière. Misharina & Polshkov (2005) ont montré que l'oxydation de l'HE de fenouil était plus rapide en présence de lumière. Après deux mois à température ambiante et en présence de lumière, le *trans*-anéthol (composant majeur de l'HE de fenouil) a été totalement oxydé en anisaldéhyde et/ou isomérisé en *cis*-anéthol.

L'isomérisation sous l'action de la lumière du *trans*-anéthol utilisé dans les boissons anisées, par exemple, engendre la formation du *cis*-anéthol. Le *cis*-anéthol présente une odeur désagréable de foin et une toxicité remarquable (DL_{50} du *trans*-anéthol : 900 mg /kg ; DL_{50} du *cis*-anéthol : 93 mg /kg) (Castro *et al*, 2010). Il faut noter que pour des concentrations identiques, deux molécules aromatiques ne présentent pas forcément les mêmes caractéristiques

olfactives, tout dépend de leur seuil de perception (déterminé par la structure et la volatilité de chacune). Par conséquent, la présence en faible quantité d'un produit de dégradation ayant un faible seuil de perception peut être suffisante pour détériorer le produit.

I.5.2. Effet de la température

La température menace aussi les HEs. Les réactions d'oxydation sous l'effet de la température peuvent être classées en 4 groupes : clivage de la double liaison, formation d'époxydes, déshydrogénation et formation d'un noyau aromatique ainsi que l'oxydation des alcools en cétones et aldéhydes (McGraw *et al*, 1999). La dégradation de l'HE de citron à 50°C est accompagnée par une perte du géraniol, néral, β -phéllandréne et du β -caryophyllène et une augmentation du *p*-cymène, de l'oxyde de limonène, de l' α -terpinéol et de l'acide gérannique (Nguyen *et al*, 2009).

I.5.3. Effet de l'oxygène

Selon la loi de Henry, la solubilité de l'oxygène dans l'HE augmente en diminuant la température. Donc l'oxydation des HEs peut se dérouler à faible température en produisant principalement des radicaux peroxydes et des hydroperoxydes. Les peroxydes sont détectés, par exemple, dans les HEs du romarin et du pin à température ambiante alors que leur taux est plus élevé dans les HEs de lavande et du thym stockées à 5°C (Turek & Stintzing, 2012). Vu leur différence de sensibilité à l'oxygène, il convient alors de trouver les conditions optimales pour le stockage de chaque HE. La réduction de l'espace de tête dans le récipient contenant l'HE semble être insuffisante pour limiter la dégradation car des réactions de réarrangement peuvent avoir lieu même en absence de l'oxygène. Il s'avère donc important de traiter les HEs par un gaz inerte (Turek & Stintzing, 2013).

I.5.4. Effet des contaminants

Les HEs sont aussi sensibles aux contaminations provenant d'une réaction entre l'HE et le matériel d'emballage, à la présence de métaux et à l'humidité. Il a été montré que le cuivre et le fer pouvaient induire des réactions d'autooxydation suite à la présence préalable d'hydroperoxydes (Choe & Min, 2006). La dégradation peut être également induite par la

présence d'autres espèces volatiles ou d'autres HEs. Cependant, ce n'est pas toujours le cas. Les HEs de laurier et de coriandre mélangées avec l'HE de fenouil, qui présente un faible pouvoir antioxydant, inhibe son oxydation (Misharina & Polshkov, 2005).

Une molécule peut suivre différentes voies de dégradation et produire une large variété de produits de dégradation. La Figure I.8 montre un exemple de dégradation des constituants de l'HE de citron (Nguyen *et al*, 2009) à 40°C, en présence d'oxygène et d'oxyde de cuivre.

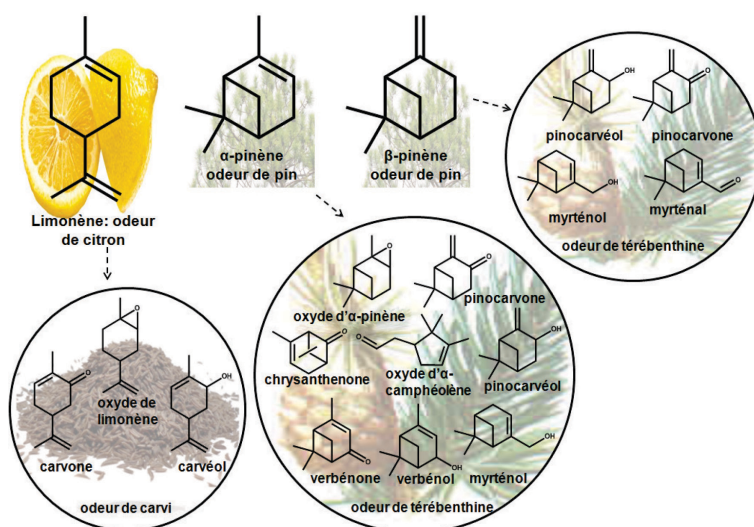


Figure I.8. Exemples de produits de dégradation des constituants des huiles essentielles (Nguyen et al, 2009).

La dégradation des HEs peut aboutir à la perturbation de leurs activités pharmacologiques. Les HEs exemptes d'impuretés et de produits de dégradation ne provoquent pas de sérieux problèmes d'irritation et de sensibilisation. Par contre, la présence des produits de dégradation tels que l'oxyde de linalol issu de l'oxydation du linalol suite à son exposition à l'air, provoque des risques d'allergie dermique (Christensson *et al*, 2010). Les hydroperoxydes de linalol, de limonène et de cumène peuvent également provoquer des réactions allergiques.

I.6. Propriétés biologiques

I.6.1. Activité antibactérienne

Face à une menace croissante de la multirésistance bactérienne aux antibiotiques, la recherche d'antimicrobiens naturels devient de plus en plus importante. Plus de 1340 plantes et

de 30000 composants sont connus pour avoir des activités antibactériennes (Tajkarimi *et al*, 2010). Parmi ces produits, une place particulière appartient aux HEs qui se sont montrées efficaces contre un large panel de bactéries pathogènes (Nazzarro *et al*, 2013).

Divers paramètres influencent l'évaluation de l'activité antimicrobienne des HEs ou de leurs composants actifs, tels que la méthode d'évaluation de cette activité, la structure moléculaire des composés actifs et leur concentration ainsi que le type de microorganismes ciblés. La structure moléculaire joue un rôle important dans les propriétés antibactériennes des HEs (Calsamiglia *et al*, 2007). En ce qui concerne les hydrocarbures, la structure cyclique et la nature des substituants du cycle semblent avoir un rôle important sur leur activité (Amaral *et al*, 1998). Un cycle substitué par un alcényle montre une activité antibactérienne plus importante que celui substitué par un groupement alkyle. Cela a été démontré par la plus grande efficacité antimicrobienne du limonène par rapport au *p*-cymène (Dorman & Deans, 2000). Le caractère hydrophobe des HEs facilite leur pénétration dans la double couche phospholipidique de la membrane bactérienne. Cela explique pourquoi les bactéries Gram-(+) (leur paroi bactérienne est constituée de plusieurs couches de peptidoglycane) et Gram-(-) (possédant une membrane externe supplémentaire riche en lipopolysaccharides) réagissent différemment vis-à-vis de ces molécules. En effet, la comparaison de l'activité antibactérienne de 27 HEs montre une plus importante susceptibilité chez les Gram-(-) que chez les Gram-(+) (Murbach Teles Andrade *et al*, 2014). La présence d'une fonction oxygénée, surtout dans les phénols, renforce cette activité (Dorman & Deans, 2000). L'importance du noyau phénolique a été démontrée par l'absence d'activité antimicrobienne du *p*-cymène (Figure I.9) (Dorman & Deans, 2000) et par le fait que les dérivés méthylés du carvacrol, du thymol et de l'eugénol (Figure I.9) ont une activité plus faible contre *E. coli* que les molécules dont ils dérivent (Mastelic *et al*, 2008). Les propriétés antibactériennes de plusieurs HEs ont été ainsi attribuées à leur contenu phénolique (Gaysinsky *et al*, 2007 ; Penalver *et al*, 2005, Santoyo *et al*, 2006 ; Tajkarimi *et al*, 2010). Les meilleures activités ont été observées pour les HEs de thym, d'origan et de clou de girofle, riches en composés phénoliques, thymol, carvacrol et eugénol, respectivement (Figure I.9). D'une façon plus précise, la présence d'un hydroxyle sur un système d'électrons délocalisés apparaît être déterminante (Ben Arfa *et al*, 2006).

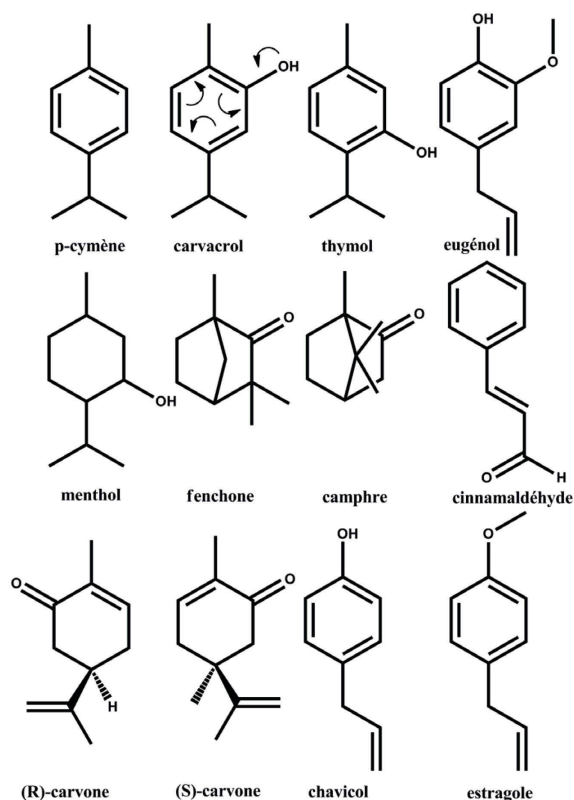


Figure I.9. Structure chimique de quelques composants des huiles essentielles ayant montré une activité antimicrobienne.

Ultee *et al* (2002) ont comparé l'activité du thymol, du menthol (Figure I.9) et de l'ester du carvacrol à celle du carvacrol. Bien que le menthol renferme un hydroxyle dans sa structure, il ne montre pas une activité significative du fait de l'absence d'un système d'électrons délocalisés. Il en est de même pour l'ester du carvacrol qui ne possède pas d'activité alors que le thymol renfermant, comme le carvacrol, un hydroxyle et un système d'électrons délocalisés montre une activité antibactérienne importante. Les différences observées ont été expliquées par le fait que la présence d'un hydroxyle sur un système d'électrons délocalisés facilite la libération d'un proton responsable de l'activité antibactérienne. Les auteurs ont proposé un mécanisme d'action pour le carvacrol au niveau des membranes bactériennes (Figure I.10).

Selon leur hypothèse, le carvacrol joue le rôle d'un transporteur transmembranaire d'un cation monovalent. Les groupements hydroxyles des noyaux phénoliques présentent généralement un caractère acide supérieur aux alcools aliphatiques. Le carvacrol est donc capable d'échanger le proton de son groupement hydroxyle contre un autre cation. De ce fait, le carvacrol natif diffuse à travers la membrane cytoplasmique vers le cytoplasme où il va se

dissocier et libérer son proton. L'ion formé peut capter un cation du cytoplasme tel que le potassium, reprendre sa forme neutre et diffuser à travers la membrane vers le cytoplasme. A l'extérieur de la cellule, le carvacrol est régénéré ce qui lui permet de diffuser de nouveau à l'intérieur de la cellule. Les résultats d'autres études sont en accord avec le mécanisme proposé. Ainsi, une fuite des ions potassium a été observée avec l'HE de l'arbre de thé dans les bactéries Gram-(+) (*Staphylococcus aureus*) et Gram-(-) (*Escherichia coli*) ainsi que dans la levure (*Candida albicans*) *in vitro* (Carson *et al*, 2002 ; Cox *et al*, 2000).

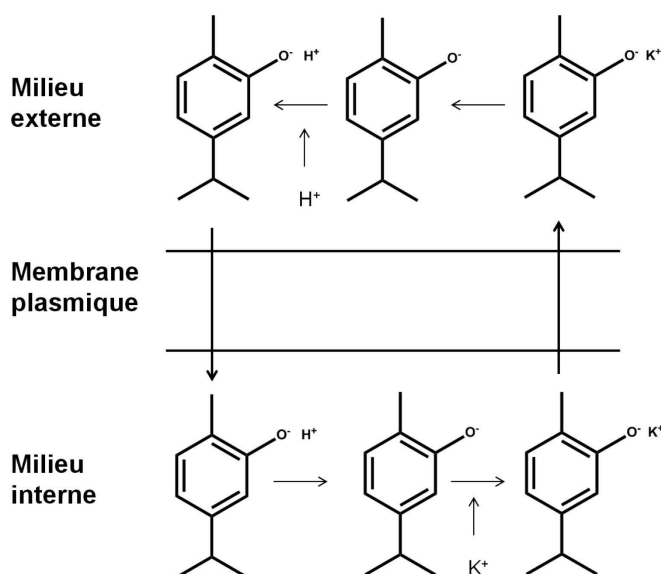


Figure I.10. Mécanisme d'action antibactérienne proposé pour le carvacrol (Ultee *et al*, 2002).

Quelques exemples récents d'HEs ou de leurs composants ayant montré une inhibition bactérienne dans les denrées alimentaires sont présentés dans le Tableau I.1.

Tableau I.1. Exemples d'huiles essentielles ou de leurs composants ayant montré une activité antibactérienne dans des denrées alimentaires.

Composants d'HEs	Concentration massique	Espèces bactériennes	Aliments
<i>T. vulgaris</i> <i>O. vulgare</i> <i>R. officinalis</i>	0,5 %	<i>S. aureus</i> <i>L. monocytogenes</i> <i>S. enteritidis</i> <i>C. jejuni</i> <i>S. enteritidis</i>	Boulettes de viandes crues ^a
Carvacrol	5%	<i>S. heidelberg</i> <i>S. typhimurium</i>	Blanc de dinde ^b
Carvacrol	0,4 %	<i>S. Enteritidis</i> <i>E. coli</i>	Haricot mungo luzerne cultivée ^c
Cinnamaldéhyde	800 ppm	<i>E. coli</i> O157:H7	Laitue ^d
HE d'origan	0,1%	<i>L. monocytogenes</i> <i>S. typhimurium</i> <i>E. coli</i> O157:H7	Laitue ^e
Thymol	0,5 g/litre	<i>L. monocytogenes</i> <i>E. coli</i>	Cidre de pomme ^f
Thymol	4,5 g/litre	<i>L. monocytogenes</i> <i>E. coli</i>	Lait allégé ^f
Eugénol <i>M. piperita</i>	0,25%	<i>S. aureus</i> , <i>B. cereus</i> , <i>E. coli</i> , <i>Y. enterocolitica</i>	Chou, persil, pulpe de papaye ^g

^aPesavento *et al*, 2015 ; ^bNair *et al*, 2014 ; ^cLandry *et al*, 2014 ; ^dYossa *et al*, 2003 ; ^eBhargava *et al*, 2015 ; ^fShah *et al*, 2012 ; ^gCatherine *et al*, 2012.

I.6.2. Activité antifongique

De nos jours, nous remarquons une recrudescence des infections fongiques liée principalement à la croissance du nombre de personnes immunodéprimées suite à l'utilisation des immunosuppresseurs ou d'antibiotiques à large spectre. De plus, nous assistons à un regain d'intérêt pour l'utilisation des plantes médicinales contre les infections fongiques (Boulogne *et al*, 2012 ; Huang *et al*, 2010). Plusieurs HEs ont été étudiées pour leurs propriétés antifongiques notamment celles qui appartiennent à la famille des *Verbenaceae* et *Labiatae* : thym, origan, clou de girofle, menthe (Tangarife-Castano *et al*, 2012). Le potentiel antifongique de ces composés,

de même que pour l'activité antibactérienne, semble être lié à la présence de certaines fonctions chimiques (Kalembe & Kunicka, 2003). Des études menées sur sept champignons (*Blastomyces dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum*, *Trichophyton rubrum*, *Fonsecaea pedrosoi*, *Aspergillus nidulans*, *Penicillium frequentans* et *Penicillium cyclopium*) ont permis de classer l'activité antifongique de différentes familles de composés comme suit : phénols > alcools > aldéhydes > cétones > éthers > hydrocarbures (Kurita *et al*, 1981). Une étude récente (Zuzarte *et al*, 2013) a rapporté que les HEs riches en phénols (thymol et carvacrol) montraient une activité plus importante que les HEs riches en fenchone (cétone) et en camphre (cétone) (Figure I.9). Chaumont et Leger (1989) ont évalué l'activité antifongique de douze composés aromatiques vis-à-vis de huit souches pathogènes de *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Microsporum canis* et cinq souches de *Trichophyton spp*. Ils ont conclu que l'eugénol, le chavicol et le 4-allyl-2-6-diméthoxyphénol (Figure I.9) renfermant un noyau phénol sont plus efficaces que les aldéhydes cinnamiques et hydroxycinnamiques. Vingt-et-un composés phénoliques ont été testés contre six modèles fongiques filamenteux. Les auteurs ont montré l'importance de la présence d'un groupement hydroxyle sur un système d'électrons délocalisé pour une importante activité antifongique comme pour l'activité antibactérienne (Zabka & Pavela, 2013).

De plus, le groupement méthoxy ne semble pas apporter une activité antifongique significative à la molécule. En effet, l'eugénol et l'isoeugénol montrent une activité antifongique moins importante que celle du thymol et du carvacrol. Cela peut être expliqué par le fait que le groupement méthoxy réduit la capacité de la molécule à libérer le proton du groupement hydroxyle (Ben Arfa *et al*, 2006 ; Zabka & Pavela, 2013). Il paraît aussi que l'activité antifongique augmente avec l'encombrement stérique de la molécule et qu'un certain degré d'hydrophobicité des composés phénoliques ou aldéhydes aromatiques est nécessaire pour une activité antifongique optimale (Dombolena *et al*, 2012 ; Zabka & Pavela, 2013). Cela a été déduit du fait que l'addition de groupements alkyles au noyau aromatique du phénol augmentait l'efficacité antifongique. La comparaison de l'activité antifongique de l'eugénol, le cinnamaldéhyde (Figure I.9) et leurs dérivés (α -méthyle cinnamaldéhyde, (E)-acide 2-méthylcinnamique et isoeugénol) a également montré le rôle crucial de la lipophilicité dans l'activité antifongique (Cheng *et al*, 2008). L'activité de différents énantiomères a été également comparée. Les HEs riches en (R)-carvone (Figure I.9) sont ainsi plus efficaces que les HEs

riches en (S)-carvone (Figure I.9) (Regnier *et al*, 2010). Le mécanisme d'action des HEs ou de leurs composants est généralement lié à la perturbation de la fonction et de la structure de la membrane (Viuda-Martos *et al*, 2008). Il apparaît qu'à de faibles concentrations, les HEs induisent un changement structural, une perméabilisation membranaire ou une inhibition de la chaîne respiratoire alors qu'à des concentrations plus élevées, des conséquences fatales sont observées allant de la détérioration membranaire à la perte de l'homéostasie cellulaire (Carson *et al*, 2002). D'autres études ont lié l'activité antifongique des HEs à l'interaction avec les enzymes responsables de la production de l'énergie et de la synthèse des constituants cellulaires (Conner & Beuchat, 1984). En effet, l'interaction des HEs avec les protéines et les enzymes membranaires induit un dérèglement de l'activité de la cellule et la libération des constituants cellulaires et par conséquent la mort du pathogène (Omidbeygi *et al*, 2007). En outre, les HEs et leurs composants peuvent interagir avec les constituants intracellulaires après avoir perméabilisé la membrane. Ils inhibent ainsi les enzymes renfermant un groupement -SH et de ce fait la synthèse des lipides de l'ADN et de l'ARN (Sofos *et al*, 1998) provoquant l'augmentation de la formation des radicaux lipidiques et par suite la mort cellulaire (Lucini *et al*, 2006).

Concernant les PPs, il a été rapporté que les composés phénoliques peuvent former des liaisons hydrogènes avec des résidus d'acides aminés clés dans les sites actifs des enzymes et inhiber ainsi leur activité (Dafarera *et al*, 2000). Les PPs tels que l'eugénol possèdent des activités inhibitrices envers l'élastase et la kératinase (Khan & Ahmad, 2011 ; Khan *et al*, 2011) et la production des aflatoxines (Hua *et al*, 1999 ; Jayashree & Subramanyam, 1999). L'estragole (Figure I.9) a montré une capacité d'inhibition de la synthèse de l'ergostérol (Khan *et al*, 2010). L'efficacité antifongique des HEs a été également démontrée pour la protection des denrées alimentaires. Quelques exemples en sont présentés dans le Tableau I.2. Il faut noter que la spécification du genre et de l'espèce des microorganismes, ainsi que la provenance de l'extrait végétal dans le cas d'une HE sont de première importance pour la comparaison des activités antimicrobiennes (Chao *et al*, 2000).

Tableau I.2. Exemples d'huiles essentielles à potentiel antifongique dans les denrées alimentaires.

Huile essentielle	Concentration	Espèces fongiques	Aliments
Cannelle de chine	500 ppm	<i>A. alternata</i>	Tomate cerise ^a
Thym, clou de girofle, sarriette	500 ppm	<i>A. flavus</i>	Ketchup ^b
Cannelle	500 ppm	<i>B. cinerea</i> , <i>C. coccodes</i>	Tomate cerise ^c
Laurier, cannelle, clou de girofle, citronnelle, orange, moutarde, thym, romarin, sauge	136 et 272 µl/ l HE volatile oil dans l'air	<i>A. flavus</i> , <i>E. repens</i> , <i>P. corylophilum</i> , <i>P. roqueforti</i>	Pain de seigle ^d
Cannelle	2.0% (v/v)	<i>P. expansum</i> , <i>R. nigricans</i> , <i>A. flavus</i>	Jujube ^e
Cannelle	3.0% (v/v)	<i>P. expansum</i> , <i>R. nigricans</i> , <i>A. flavus</i>	Orange ^e

^aFeng & Zheng, 2007 ; ^bOmidbeygi *et al*, 2007 ; ^cTzortzakos, 2009 ; ^dSuhr & Nielsen, 2003 ; ^eXing *et al*, 2010.

I.6.3. Activité antioxydante

La peroxydation lipidique, initiée par les radicaux libres de l'oxygène (ROS, *reactive oxygen species*, espèces réactives à l'oxygène), est un phénomène général qui concerne les lipides contenant des acides gras insaturés (membranes cellulaires, lipoprotéines, etc). Le stress oxydant est impliqué dans de nombreuses pathologies : cancer, diabète, maladies cardiovasculaires, rhumatismes, Alzheimer, cataracte, vieillissement accéléré, etc. Des molécules néfastes sont produites et la surexpression de certains gènes est observée. L'oxydation des lipides pose également de sérieux problèmes pour les industries agroalimentaires. Elle conduit à des altérations au niveau du goût, de l'odeur et de la couleur et donc à la perte de la qualité et de la sécurité des aliments (Magro *et al*, 2006). De plus, l'utilisation, à long terme, d'antioxydants synthétiques comme par exemple le butylhydroxyanisole (BHA) et le butylhydroxytoluène (BHT) dans les domaines agroalimentaire, cosmétique et pharmaceutique est suspectée d'effets tératogènes, mutagènes et cancérigènes (Amorati *et al*, 2013 ; Botterweck *et al*, 2000). Les HEs sont connues pour leurs propriétés antioxydantes. Leur capacité à piéger les radicaux libres joue un rôle primordial dans la conservation des denrées alimentaires (Amorati *et al*, 2013 ; Chemat *et al*, 2007) ainsi que dans la prévention de certaines maladies (cardiopathies, cancer, Alzheimer, etc.). Généralement, l'activité antioxydante est due à la présence de phénols et de polyphénols

dans l'HE (Santhakumar *et al*, 2014). Nous distinguons deux sortes d'activité antioxydante selon le niveau de leur action : une activité primaire (directe) et une activité préventive (indirecte). Les composés qui ont une activité primaire vont interrompre la chaîne autocatalytique de l'oxydation (Korkina, 2007; Miguel, 2010), alors que ceux qui possèdent une activité préventive sont capables de retarder l'oxydation par des mécanismes indirects tels que la complexation des ions métalliques ou la réduction d'oxygène, etc. (Miguel, 2010).

La Figure I.10 illustre le mécanisme antioxydant des phénols qui présentent une activité antioxydante primaire.

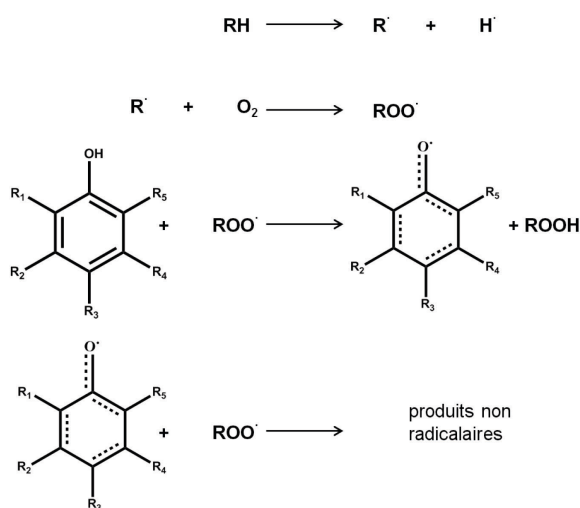


Figure I.10. Mécanisme antioxydant des phénols.

I.6.4. Activité anti-inflammatoire

La réaction inflammatoire fait intervenir une multitude de mécanismes d'action selon la nature du pathogène, l'organe où elle se déroule ainsi que le terrain physiologique de l'hôte. L'inflammation nécessite une régulation fine pour rétablir l'homéostasie du tissu lésé après l'élimination du pathogène. Le potentiel anti-inflammatoire des HEs a été évalué dans plusieurs études (Adorjan & Buchbauer, 2010 ; da Silveira E Sa *et al*, 2014 ; Kim *et al*, 2004 ; Korkina *et al*, 2011; Zuzarte *et al*, 2013). Il a été démontré que les HEs et leurs composants possèdent un potentiel anti-inflammatoire et une capacité de modulation des systèmes enzymatique et immunitaire (Kim *et al*, 2004). Elles peuvent cibler différents sites d'action au niveau cellulaire et leur effet ne peut pas être attribué à un mécanisme unique à cause de la large variabilité de

leurs composants. Le mode d'action du *trans*-anéthol, par exemple, a été attribué à l'inhibition de l'activité de la myeloperoxydase (Domiciano *et al*, 2013; Ritter *et al*, 2013), la réduction du nombre des cellules inflammatoires et de MMP-9, TNF et NO[•] ainsi qu'à l'inhibition de l'activation du NF-κB par blocage de la dégradation de l'IκB-α (Kang *et al*, 2013). L'activité de l'eugénol a été attribuée à l'inhibition du métabolisme de l'acide arachidonique et du thromboxane A₂ (Chen *et al*, 1996) et la production des prostaglandines et leucotriènes (Anamura *et al*, 1988), à la modulation des médiateurs pro-inflammatoires (Koh *et al*, 2013) et à l'inhibition de l'agrégation des plaquettes (Chen *et al*, 1996).

La Figure I.11 décrit quelques mécanismes possibles de l'activité anti-inflammatoire des PPs (da Silveira E Sa *et al*, 2014).

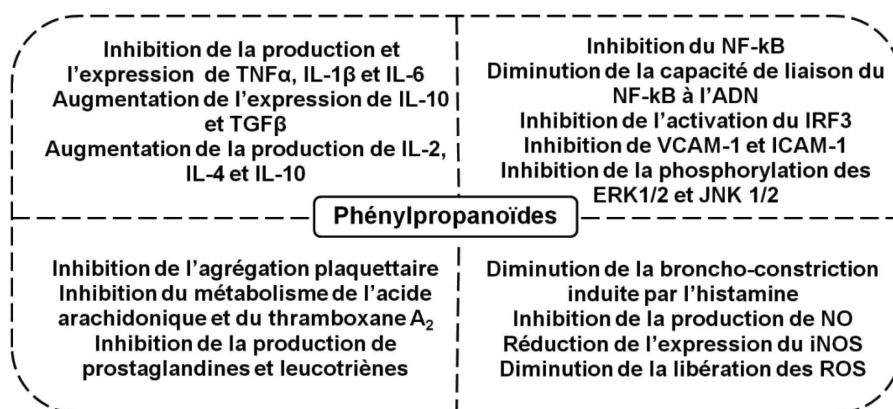


Figure I.11. Mécanismes possibles de l'activité anti-inflammatoire des phénylpropanoïdes (da Silveira E Sa *et al*, 2014).

Plus récemment, les HEs ont été reconnues également pour leurs propriétés anticancéreuses (Anantharaman *et al*, 2013 ; Bhalla *et al*, 2013 ; Ravishankar *et al*, 2013).

En plus des effets antibactériens, antifongiques et anti-inflammatoires, les HEs et leurs composants ont montré d'autres effets biologiques (Buchbauer & Jirovetz, 1994 ; Horowitz *et al*, 1999) (Tableau I.3).

Tableau I.3. Différents effets pharmaceutiques des huiles essentielles (Buchbauer & Jirovetz, 1994 ; Horowitz *et al*, 1999).

Effet biologique	Huile essentielle
Analgésique	Vanille, lavande, menthe, oignon, agrume, romarin, camomille, cannelle, citron, gingembre
Anti-rhumatoïde	Lavande, oignon, agrume, romarin, thym
Antidiabétique	Vanille, oignon, camomille, citron
Antigrippal	Pin, lavande, menthe, oignon, romarin, thym, camomille, cannelle
Antiparasitaire	Thym, sarriette des montagnes
Antiseptique	Eucalyptus
Antispasmodique	Cannelle, héliochryse
Antitussif	Romarin
Antiviral	Ravintsara, bois de Hô, cannelle
Anxiolytique	Mélisse, verveine
Contre la diarrhée	Vanille, gingembre, clou de girofle, lavande, menthe, oignon, origan, romarin, thym, camomille, cannelle, citron
Cicatrisant	Ciste, immortelle, myrrhe, amande douce
Coalescent	Pin, clou de girofle, lavande, oignon, thym
Détoxifiant	Lavande
Diaphorétique	Pin, lavande, romarin, thym, cannelle
Digestif	Estragon, cumin
Diurétique	Pin, lavande, oignon, thym, fenouil, citron
Hypogène	Lavande, origan, basil, camomille
Hypotensif	Lavande, fenouil, citron, ylang-ylang
Insecticide	Eucalyptus
Laxatif	Pin, gingembre, clou de girofle, menthe, oignon, agrume, romarin, fenouil, basil, cannelle
Perte de poids	Oignon, cannelle, citron
Pyrogène	Gingembre, fenouil, camomille, citron
Sédatif	Menthe, oignon, citron

I.7. Utilisations

Les HEs trouvent de nombreux débouchés dans les secteurs pharmaceutique, agroalimentaire et cosmétique.

I.7.1. Domaine pharmaceutique

I.7.1.1. Législation

Il existe de nombreux produits de consommation courante contenant des HEs auxquels le large public est souvent exposé. Sept HEs ont été inscrites dans la Pharmacopée Européenne en 1999, l'HE d'anis, d'eucalyptus, du clou de girofle, d'oranger amer, de lavande, de la menthe

poivrée et du thym. Les produits traditionnels à base de plantes ont fait le sujet de la directive 2004/24/CE du 31 Mars 2004 modifiant la directive 2001/83/CE. Cette directive concerne les produits à des fins thérapeutiques, présents sur le marché d'un pays de l'Union Européenne ou d'un pays tiers. Ces produits doivent répondre aux critères de cette directive et démontrer leur innocuité et leur efficacité désirée.

Au sein de l'Agence Européenne du Médicament (EMA), un comité sur les médicaments à base de plantes (HMPC : Herbal Medicinal Plant Committee) a été créé depuis novembre 2004. Le HMPC établit des monographies pour contrôler l'enregistrement des médicaments à base de plantes. Les HEs doivent obéir à ces monographies vu qu'il n'existe pas de réglementation spécifique concernant leur utilisation dans les médicaments. Elles doivent satisfaire notamment les critères de l'ordonnance n°2007-613 du 26 avril 2007 des médicaments traditionnels à base de plantes (ils sont conçus pour être utilisés sans l'intervention d'un médecin à des fins de diagnostic, de prescription ou de suivi du traitement ; ils sont exclusivement destinés à être administrés selon un dosage et une posologie spécifiés ; ils sont administrés par voie orale, externe ou par inhalation ; la durée d'usage traditionnel est écoulée ; les données sur l'usage traditionnel du médicament sont suffisantes) (Chapitre 1^{er}, article 2) ensuite faire une demande auprès de l'AFSSAPS pour l'enregistrement de médicament traditionnel à base de plantes.

Dolirhume aux huiles essentielles ® (solution pour inhalation à visée décongestionnante), Balsolene ®, solution pour inhalation par fumigation, Lumbalgine ® (crème antalgique), Euvanol ® (solution nasale antiseptique) sont, entre autres, des exemples de médicaments à base d'HEs.

I.7.1.2. Utilisation

Les HEs et leurs composants actifs peuvent être administrés principalement par quatre modes: la voie orale, la voie rectale, la voie cutanée et la voie pulmonaire. Le choix de la voie d'administration dépend de la composition chimique de l'HE, de la fin thérapeutique et de la sensibilité du patient en question (Pisseri *et al*, 2008). Vue leurs diverses propriétés biologiques (Guimaraes *et al*, 2013 ; Kumar *et al*, 2013 ; Pazyar *et al*, 2013 ; Pisseri *et al*, 2008 ; Rozza & Pellizon, 2013) ils sont utilisés pour :

a) L'aromathérapie : est l'utilisation médicale des HEs dans les soins ou les cures. Cette pratique peut aussi se faire par inhalation des odeurs dont les effets bénéfiques se traduisent au niveau du système limbique du cerveau. Il existe aussi le massage aromathérapique (massage aux HEs) fréquemment appliqué par les aromathérapeutes. En fait l'aromathérapie est une niche de la « phytothérapie » (Lee *et al*, 2012).

b) La phytothérapie : est l'utilisation des plantes médicinales en elles mêmes dans des préparations galéniques ou pharmaceutiques (Pandey *et al*, 2011).

c) L'homéopathie : est l'utilisation d'une substance fortement diluée et dynamisée. A l'origine, cette substance produit des troubles semblables à ceux présentés par le patient (Fisher, 2012).

I.7.2. Domaine agro-alimentaire

Plusieurs HEs sont GRAS et approuvées par la FDA (U.S. Food and Drug Administration) (Smith *et al*, 2005). Elles sont utilisées dans les domaines de la biscuiterie, des boissons, des confiseries, des produits laitiers, des produits salés, du tabac et de la nutrition animale. Dans le domaine phytosanitaire et agro-alimentaire, les HEs et leurs composants actifs peuvent être employés pour la protection contre les champignons phytopathogènes et les moisissures qui envahissent et détériorent les denrées alimentaires (Caputi & Aprea, 2011 ; Friedman & Rasooly, 2013 ; Lang & Buchbauer, 2012 ; Lucera *et al*, 2012 ; Singh *et al*, 2010).

Les HEs sont actuellement étudiées pour leur efficacité comme conservateurs naturels où elles permettent la réalisation d'une plus-value autant intéressante que leur apport organoleptique. Par conséquent, elles peuvent être utilisées pour inhiber la croissance des bactéries (la multiplication, la sporulation et la synthèse des toxines bactériens), des moisissures (la germination des spores, l'élongation du mycélium, la sporulation et la toxinogénèse) et des levures (la biomasse et la production de mycélium) dans un produit alimentaire (Calo *et al*, 2015). Les HEs ont également montré une efficacité contre les virus rencontrés dans les denrées alimentaires tels que les Norovirus humains (NoVs), le virus de l'hépatite A (HAV) et les Rotavirus (RoVs) (Li *et al*, 2013). En outre, grâce à leur activité contre les bactéries zoonotiques entéropathogènes, les HEs peuvent remplacer les antibiotiques dans l'alimentation des animaux (Bento *et al*, 2013 ; Wannissorn *et al*, 2005).

Plus encore, l'aromatisation est conseillée pour masquer les saveurs désagréables d'une denrée. Cette pratique est typiquement appliquée pour des denrées développant une saveur de fève ou de poisson (Kasahara & Osawa, 1998).

I.7.3. Domaine cosmétique

C'est l'un des plus larges débouchés des HEs, particulièrement, dans le secteur de la parfumerie, des produits cosmétologiques et des produits d'hygiène (Aburjai & Natsheh, 2003 ; Kunicka-Styczynska *et al*, 2009 ; Kusumawati & Indrayanto, 2013). Plusieurs dizaines d'HEs de plantes différentes peuvent entrer dans la composition d'un seul parfum comme la rose, la lavande, le bergamotier, le giroflier, la vanille, le cèdre, la cannelle, l'eucalyptus, la menthe, le jasmin, le patchouli, la violette, etc. (Ellena, 2008). Les HEs sont généralement intégrées dans les crèmes à effets analgésiques, les produits solaires, les huiles de massage et les bains calmants ou relaxants. Le massage aromathérapique est fréquemment prescrit pour les patients qui souffrent de démence ou de troubles du sommeil (Taavoni *et al*, 2013). En plus de leur effet bénéfique, les HEs jouent un rôle très important sur le mental et la satisfaction du consommateur en parfumant le produit. L'éventail des HEs s'est considérablement élargi ces dernières années.

Les composants d'HE de part leurs propriétés physicochimiques et leurs importantes applications dans les différents domaines sont des molécules instables et sensibles. Leur faible solubilité dans l'eau et par voie de conséquence dans les liquides biologiques implique une faible biodisponibilité. Une augmentation des doses administrées aux patients sera ainsi nécessaire pour atteindre l'objectif thérapeutique visé. Cela peut induire un accroissement des effets secondaires tels que les irritations au niveau digestif et cutané. De plus des pertes sont observées dans la quantité d'HEs appliquée par évaporation, oxydation, etc. ce qui induit une diminution de leur efficacité. Des techniques d'encapsulation sont souvent nécessaires pour pallier à ces problématiques. L'encapsulation permet de transformer les composés liquides en poudre ce qui peut résoudre les problèmes de stockage et de conservation. De plus, ces techniques offrent des fonctionnalités de solubilisation, protection ou de libération bien spécifiques qui permettent de meilleures performances des composés encapsulés. Il existe un large éventail de systèmes d'encapsulation tels que les cyclodextrines (CDs), les liposomes, la gélatine, la gomme arabique, la glycine de soja, etc. Les CDs sont intensivement étudiées comme matériel d'encapsulation des HEs ou de leurs composants (Marques, 2010 ; Martins *et al*, 2014 ; Pinho *et al*, 2014 ; Sherry *et*

al, 2013). Cependant, le potentiel d'utilisation des CDs avec ces molécules est loin d'être totalement exploré. Nous nous sommes ainsi attachés dans ce travail de thèse à essayer de comprendre les forces régissant les interactions entre les CDs et quelques PPs, classe de composants des HEs qui se caractérisent par une homologie de structures et de propriétés. Nous avons également évalué l'effet de l'encapsulation sur différentes caractéristiques physico-chimiques et propriétés biologiques de ces PPs.

Le second chapitre de généralités sera consacré à une présentation générale des CDs en commençant par un historique succinct suivi d'une description des caractéristiques des CDs et de leurs complexes d'inclusion et de leurs différents domaines d'applications.

Chapitre II. Les cyclodextrines

II.1. Vectorisation et chimie supramoléculaire

A la fin du XIX^{ème} siècle, depuis l'énoncé de la théorie «*Magic Bullet*» par l'immunologiste et médecin allemand Paul Ehrlich, les recherches sur la vectorisation ont fait de considérables progrès. Cette théorie consiste en une «balle magique» jouant le rôle d'un hôte pouvant transporter une molécule dans l'organisme, à des concentrations biologiquement actives et ayant une forte affinité avec les sites d'action (Winau *et al*, 2004). Ainsi fut posé le concept de la vectorisation qui est devenu une discipline scientifique à part entière. Le vecteur doit être toléré par le patient et ne présenter aucun risque de toxicité. De plus, le vecteur idéal doit protéger le principe actif (PA) jusqu'à sa cible et permettre sa libération d'une manière dite chrono-biologique, c.-à-d. tenant compte du rythme et de l'état physiologique de l'organisme. Nombreux sont les vecteurs étudiés. Ils sont soit de type biologique vivant (virus modifiés, bactéries, hématies), soit particulaire (nanoparticules, liposomes, etc.), soit encore moléculaire (polymères conjugués, complexes d'inclusion de cyclodextrines (CDs), anticorps conjugués, etc.).

En raison de cette variété, seuls les complexes d'inclusion de CDs seront présentés dans cette partie bibliographique. Les interactions hôte-invité à la base de la formation des complexes d'inclusion de CD font partie des interactions gouvernant la chimie supramoléculaire. La chimie supramoléculaire est une discipline à l'interface de la chimie, la physique et la biologie. Jean-Marie Lehn définit la chimie supramoléculaire comme «la chimie des assemblages de molécules et des liaisons intermoléculaires» ou «la chimie au delà de la molécule individuelle». Ainsi, cette chimie est dominée par des interactions intermoléculaires non covalentes formant une association bien organisée (Lehn *et al*, 1988). Généralement, les assemblages supramoléculaires sont formés d'une molécule hôte de grande taille (enzymes, composés cycliques, etc.) capable de piéger ou stabiliser un invité (allant d'un atome jusqu'à une macromolécule ou polymère). Les différents composants du complexe s'arrangent mutuellement dans des structures stabilisées par des forces intermoléculaires (Cram *et al*, 1986). Depuis sa conception, la chimie supramoléculaire n'a pas cessé de s'élargir et de se diversifier dans divers domaines tels que la biomimétique, la physique et la science des matériaux. En 1987, la chimie supramoléculaire a obtenu définitivement ses «lettres de noblesse » lorsque J. M. Lehn, D. J. Cram et C. J. Pedersen

ont reçu le prix Nobel de chimie pour leurs travaux respectifs sur les cryptates (Lehn *et al*, 1985), les sphérants (Cram *et al*, 1986), et les éthers couronnés (Pedersen *et al*, 1988) qui sont des molécules aux interactions hautement spécifiques et sélectives.

II.2. Historique des cyclodextrines

Dans une revue récente, Crini (2014) a divisé l'histoire des CDs en cinq périodes : la découverte, la période de doute, la période de maturation, l'exploration et l'utilisation. Comme la période de doute et la période de maturation sont marquées néanmoins par plusieurs résultats contradictoires nous décrivons dans ce mémoire l'historique des CDs suivant trois grandes périodes : la découverte, l'exploration et la période d'utilisation et d'application. Quelques étapes clés sont résumées dans le Tableau II.1.

II.2.1. La découverte

En 1891, Villiers rapporte l'obtention, à partir de la digestion d'1 kg d'amidon par les bactéries *Bacillus amylobacter*, de 3g d'une substance cristalline qu'il nomme «cellulosine» vu sa forte similarité physicochimique avec la cellulose, notamment la stabilité envers l'hydrolyse acide et l'absence de propriétés réductrices (Villiers, 1891). Vingt ans plus tard, Schardinger isole la souche bactérienne *Bacillus macerans* responsable de la production de la CD Glucosyltransférase (CGTase), enzyme qui a la propriété de transformer l'amidon en CD. De nos jours, *Bacillus macerans* reste la source d'enzyme la plus utilisée. Schardinger décrit le mode d'obtention et de purification de l' α - et β -dextrine qu'il baptise «dextrines de Schardinger». Il les différencie par leur capacité à former des complexes de couleurs différentes avec l'iode, gris-vert et rouge-pourpre, respectivement (Schardinger, 1903 ; 1911).

Durant les années 1930, Freudenberg et son équipe élucident la structure de l' α - et la β -dextrine. Ils ont montré, en se basant sur des données de pouvoir rotatoire, que les CDs ont une structure cyclique composée d'unités maltose reliées par des liaisons glycosidiques α -(1-4). À la fin des années 1930, il évoque le caractère hydrophobe de la cavité des dextrines et leur capacité à former des complexes (Freudenberg *et al*, 1939).

Tableau II.1. Quelques étapes de l'histoire des cyclodextrines.

Années	Evènements
1891	Découverte des celluloses par Villiers ^a
1903	Première publication sur les α - et β -dextrines par Sharding ^b
1911	Publication du dernier article de Sharding sur les dextrines ^c
1924-1938	Description et préparation des CDs méthylées ^d
1935	Découverte de la γ -CD ^e
1938-1952	Elucidation de la structure de l' α -, β - et γ -CDs ^f
1953	Premier brevet sur les CDs pour Freudenberg, Cramer et Plieninger en Allemagne ^g
1954	Premier livre sur les CDs et leur capacité de complexation ^h
1965	Découverte de CDs renfermant jusqu'à 12 unités de glucose
	Premières études de toxicité des CDs ⁱ
	Classification des complexes d'inclusion selon leurs profils de diagrammes de solubilité ^j
1965-1968	Monographies sur les CDs ^{k,l}
1976	α - et β -CDs sont approuvées au Japon comme additifs alimentaires. La prostaglandine E ₂ /β-cyclodextrine (Prostarmon E TM) est commercialisée au Japon par Ono Pharmaceutial Co. ^m
1981	Organisation du premier symposium international sur les CDs à Budapest par Szejtli ^m
1981-1986	Recrudescence dans la synthèse des dérivés de CDs et des brevets en Europe et aux Etats Unis ^m
1988	Commercialisation des tablettes de Piroxicam/β-cyclodextrin (Brexin) en Europe par Chiesi Farmaceutici (Italie) ^m
1990	Un brevet sur la sulfobutyl-éther-β-cyclodextrine par Stella et Rajewski ⁿ
1997	Commercialisation de la solution pharmaceutique à administration orale Itraconazole/HP-β-CD (Sporanox) aux Etats Unis ⁿ
2003	26000 publications sur les CDs ^o
2008	Commercialisation du BRIDION® : γ -CD modifiée utilisée comme antidote de certains anesthésiques ^p
2008-2014	Applications des CDs dans les domaines : pharmaceutique, cosmétique, catalyse, dépollution, chromatographie, textile, etc. ^p

^aVilliers, 1891; ^bSharding, 1903; ^cSharding, 1911; ^dFreudenberg & Meyer-Delius, 1938; ^eFreudenberg & Jacobi, 1935; ^fFreudenberg *et al*, 1939; ^gFreudenberg *et al*, 1953; ^hCramer, 1954; ⁱFrench *et al*, 1965; ^jHiguchi & connors, 1965; ^kThoma & Stewart, 1965; ^lCaeser, 1986; ^mBrewtser & Loftsson, 2007; ⁿLoftsson & Duchene, 2007; ^oSzejtli, 2004; ^pCrini, 2014.

Freudenberg et Carmer découvrent et élucident la structure de la γ -dextrine entre 1948 et 1950 (Freudenberg & Cramer, 1948). French décrit des protocoles pour préparer les dextrines qu'il nommait cyclohexaamylose, cycloheptaamylose et cyclooctaamylose (French, 1957).

II.2.2. L'exploration

Les groupes de French (French, 1957) et Cramer (Cramer, 1954) étudient la production des CDs. Le premier groupe postule la présence de CDs ayant un nombre plus important d'unités de glucose alors que le second a été attiré par leur capacité à former des complexes d'inclusion. Freudenberg et Cramer ont suggéré la présence de forces hydrophobes impliquées dans la formation des complexes (Freudenberg & Cramer, 1948). La révolution dans le monde des CDs reste toujours le brevet de Freudenberg, Cramer, et Plieninger (Freudenberg *et al*, 1953). Ils démontrent la capacité des CDs à protéger les substances oxydables, augmenter la solubilité et réduire la perte des substances volatiles par la formation de complexes d'inclusion. Les travaux sur les CDs ont été ensuite révisés par French (French, 1957). En 1956, Cramer introduit le concept de complexation comme étant un équilibre association-dissociation et aucune liaison covalente existe entre la CD et l'invité. Au fur et à mesure, les publications et les monographies sur les CDs augmentent. Pourtant, à cette époque l'utilisation des CDs présentait un risque à cause des études de toxicité erronées menées par French (Brewtser & Loftsson, 2007).

II.2.3. Utilisation et application

Des études de toxicité ont démontré que les CDs étaient exempts de tout risque intrinsèque alors que la toxicité démontrée par French était due aux impuretés, résidus de solvants organiques et/ou mode d'administration des CDs. Ces études ont accru énormément le nombre de publications sur les CDs pour atteindre 26000 publications en 2003 (Szejtli, 1997 ; 2004). Depuis 1980, les études montrent que la formation des complexes d'inclusion peut se faire aussi bien à l'état solide qu'en solution. Différentes méthodes de préparation des complexes ont été ainsi proposées. Durant la fin des années 1990 jusqu'à début des années 2000, des études proposent des mécanismes d'inclusion pour expliquer la formation des complexes (Liu & Guo, 2002). Szejtli a résumé les données de la littérature sur les facteurs influençant la formation des complexes d'inclusion (Szejtli, 1988; 1997; 2004). Outre les complexes d'inclusion, de nombreux dérivés de CDs ont été également décrits à partir des années 1990. À partir des années 2000 et jusqu'à nos jours, de nombreuses équipes se sont intéressées au développement de matériaux et polymères de CDs surtout pour l'application dans la remédiation et la décontamination de l'air, des eaux et des sols (Crini & Morcellet, 2002; Landy *et al*, 2012;

Mocanu *et al*, 2001; Morin-Crini & Crini, 2013), la pharmacie (Kurkov & Loftsson, 2013; Szente & Szeman, 2013), la vectorisation des gènes (Xu *et al*, 2014), la chimie supramoléculaire (Wenz, 2009), la catalyse (Karakhanov & Maximov, 2010), l'augmentation de la perméabilité des biomembranes (Loftsson, 2012), les arômes (Marques, 2010), la cosmétologie (Duchene *et al*, 2009), le textile (Buschmann *et al*, 2001) et la synthèse des nanomatériaux pour la vectorisation des médicaments (Yameogo *et al*, 2014).

II.3. Caractéristiques physicochimiques des cyclodextrines

Les CDs naturelles sont obtenues par dégradation enzymatique suivie d'une transglycosylation intramoléculaire de l'amidon sous l'action de la CGTase (Schmid, 1989) (Figure II.1).

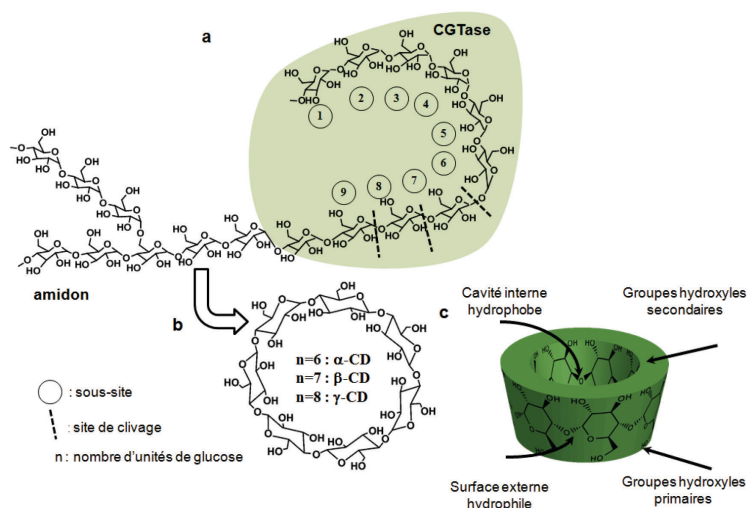
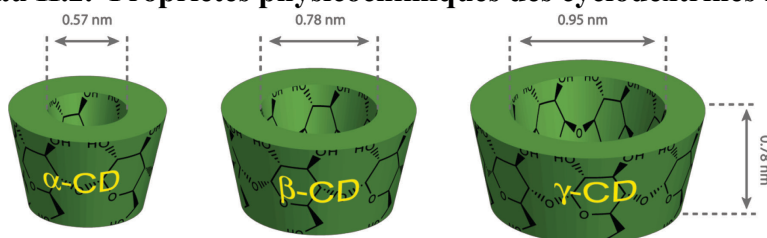


Figure II.1. a) Schéma général de la dégradation enzymatique de l'amidon b) structure chimique et c) structure tridimensionnelle des cyclodextrines.

Ce sont donc des oligosaccharides cycliques formés d'unités α -D-glucopyranose, en conformation chaise, reliés par des liaisons glycosidiques $\alpha(1\rightarrow4)$ et ne présentant ainsi aucun pouvoir réducteur. Cet arrangement est à l'origine de la forme d'un cylindre conique des CDs.

Les CDs naturelles les plus rencontrées renferment 6, 7 et 8 unités glucosidiques et sont désignées α -, β - et γ -CD, respectivement. Les principales caractéristiques physicochimiques de ces trois CDs sont regroupées dans le Tableau II.2.

Tableau II.2. Propriétés physicochimiques des cyclodextrines natives.

Propriétés	α -CD	β -CD	γ -CD
Unités de glucose	6	7	8
Formule brute	$C_{36}H_{60}O_{30}$	$C_{42}H_{70}O_{35}$	$C_{48}H_{80}O_{40}$
Carbones asymétriques	30	35	40
Masse moléculaire	972	1135	1297
Diamètre de la cavité (Å)	5,7	7,8	9,5
Diamètre de la périphérie (Å)	14,6-15	15,4-15,8	17,5-17,9
Volume de la cavité (Å ³)	173	262	427
Solubilité dans l'eau à 25°C (g/100 mL)	14,5	1,85	23,2
Hauteur du cône (Å)	7,8	7,8	7,8
Molécules d'eau retenues dans la cavité	6-8	11-12	13-17
Température de fusion (°C)	275	280	275
pKa à 25°C	12,3	12,2	12,1
LogP à 25°C	-13	-14	-17
Pouvoir rotatoire à 25°C	+150,5	+162,5	+177,4
Constante de diffusion à 40 °C	3,4	3,2	3
H donneur	18	21	24
H accepteur	30	35	40
Hydrolyse par les amylases digestives	négligeable	lent	Rapide

Brewtser & Loftsson, 2007; Kurkov & loftsson, 2013; Loftsson & Brewtser, 2010; Loftsson & Brewtser, 2011; Stella & He, 2008.

La structure des CDs, alliée à l'orientation particulière des diverses fonctions hydroxyles des unités glucopyranose, leur confère un caractère amphiphile caractéristique ; une cavité centrale relativement hydrophobe tapissée par des atomes de carbone et d'hydrogène (surface de contact avec la molécule invitée) et un extérieur relativement hydrophile (surface de contact avec le solvant) garni par des groupements hydroxyles primaires (portés par les carbones C6 autour de l'entrée étroite du cône) et secondaires (portés par les carbones C2 et C3 autour de l'entrée large du cône) (Szjetli, 2004). C'est grâce à ce caractère amphiphile que les CDs, en jouant le rôle d'une molécule hôte, sont capables d'inclure dans leur cavité des invités hydrophobes pour former des complexes d'inclusion.

Les CDs natives sont des composés cristallins, homogènes et non hygroscopiques. Le diamètre de la cavité varie avec le nombre d'unités glucopyranose alors que la hauteur est la même pour les trois CDs. Ainsi, le diamètre externe et le volume de la cavité augmentent en allant de l' α -CD à la γ -CD. La solubilité aqueuse varie d'une façon moins régulière, la β -CD possédant la plus faible solubilité. Ceci peut s'expliquer par le fait que la proximité des hydroxyles secondaires de la β -CD favorise la formation d'une ceinture complète de liaisons hydrogène qui lui confère une forte stabilisation. Toutefois, la β -CD est la plus intéressante du point de vue complexation et représente au moins 95% de la production de CDs (Blach *et al*, 2008). Plusieurs méthodes ont été développées pour améliorer sa solubilité tels que des modifications chimiques ou enzymatiques et la synthèse de polymères (Gidwani & Vyas, 2014; Harada *et al*, 2009; Schmidt *et al*, 2014).

II.4. Dérivés des cyclodextrines

Les objectifs principaux de ces modifications sont (Szente & Szjetli, 1999; Marques, 2010) :

a) augmenter la solubilité aqueuse des CDs; *b)* augmenter leur capacité de complexation; *c)* accroître leur affinité pour une molécule donnée; *d)* introduire des groupements spécifiques facilitant la complexation; *e)* synthétiser des polymères; *f)* diminuer les dégâts provoqués au niveau des membranes cellulaires. Les dérivés hémi-synthétiques obtenus par substitution des hydroxyles des CDs natives sont les plus utilisés (Del Valle, 2004). Nous rencontrons surtout des dérivés de type hydroxypropyle (HP), sulfobutyle (SBE) et méthyle (ME).

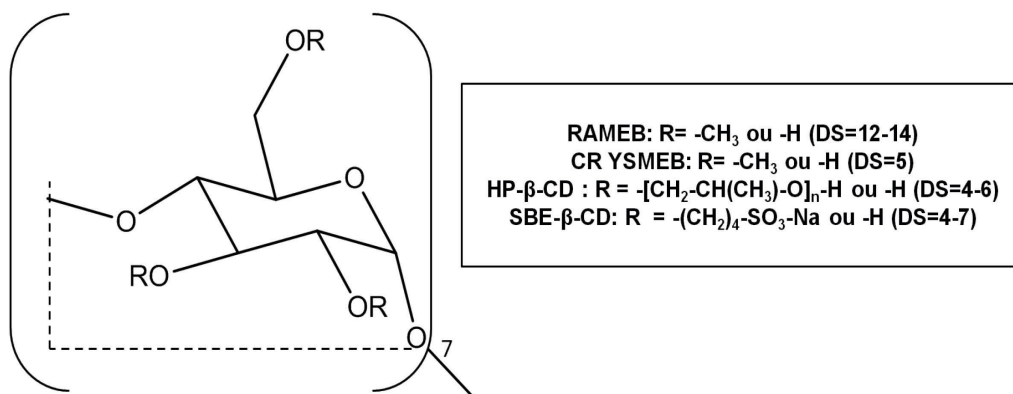


Figure II.2. Schéma général des dérivés de la β -cyclodextrine (DS : degré de substitution).

II.4.1. Les dérivés méthylés

Le greffage de groupements méthyles améliore notablement la solubilité des CDs dans l'eau (>500 mg/ml) (Loftsson & Duchene, 2007). Les formes commerciales les plus intéressantes sont la RAMEB (β -CD méthylée, de manière aléatoire, sur l'intégralité des hydroxyles primaires ainsi que sur 7 à 9 hydroxyles secondaires) et la CRYSMEB (méthylée en position 2 de la β -CD) (Figure II.2). Ces dérivés présentent une meilleure solubilité que la CD native et une bonne capacité d'inclusion pour les produits faiblement solubles dans l'eau. Néanmoins, la RAMEB reste plus attractive pour le domaine pharmaceutique car elle présente une capacité de complexation importante (Davis & Brewster, 2004).

II.4.2. Les dérivés hydroxypropylés

Ces dérivés sont produits par la réaction de la β -CD avec l'oxyde de propylène en milieu alcalin. L'HP- β -CD (Figure II.2) se caractérise par une très grande solubilité dans l'eau (> 600 mg/ml) (Loftsson & Duchene, 2007) à cause de son fort caractère hydrophile. Par conséquent, l'HP- β -CD présente un large intérêt dans le domaine pharmaceutique (Stella & He, 2008).

II.4.3. Les dérivés sulfobutylés

Les sulfobutyléther- β -CDs (SBE- β -CD) ont de fortes solubilités aqueuses et un pouvoir de solubilisation important. Ce dérivé est produit à l'échelle industrielle sous le nom de Captisol® (www.cydexinc.com). Ce dernier présente un degré de substitution entre 6 et 7 et porte une charge négative dans les conditions physiologiques. Cela est dû aux groupements d'acide sulfonique qui lui confèrent un pKa très faible. Les chaînes butyles et la répulsion des charges négatives permettent d'allonger la cavité. Par conséquent, cette CD présente une meilleure affinité pour accueillir les invités. La charge négative lui permet aussi de complexer les invités ayant une charge positive. Comme l'HP- β -CD, le captisol® est intéressant pour l'utilisation pharmaceutique vu sa faible toxicité et sa solubilité élevée (> 500 mg/ml) (Loftsson & Duchene, 2007).

II.4.4. Caractéristiques générales des dérivés de cyclodextrines

Les propriétés physicochimiques des dérivés de CDs et leur capacité de complexation dépendent à la fois du type et du nombre de substituant par unité de CD (Loftsson & Brewster, 2010; Schonbeck *et al*, 2010; 2011). Donc un dérivé de CD est caractérisé par les paramètres suivants : a) *le degré de substitution moyen (DS)* qui est le nombre moyen de groupements hydroxyles substitués par molécule entière de CD (le DS varie de 0 (aucune substitution) à $3n$ (3 et n étant le nombre d'hydroxyles par unité d' α -D-glucopyranose et le nombre de glucose de la CD, respectivement)) et b) *le degré de substitution molaire moyen (MS)* qui est le nombre moyen de substituant par unité d' α -D-glucopyranose (généralement, le MS varie de 0 à 3). Parfois, le groupement hydroxypropyle peut lui-même être substitué par un second groupement qui réagit avec son groupement hydroxyle. Dans ce cas, la valeur du MS peut dépasser 3.

Dans le cadre de ce travail, nous avons utilisé, en plus des CDs natives, la RAMEB (DS = 12,6), la CRYSMEB (DS = 4,9), et l'HP- β -CD (DS = 5,6).

II.5. Propriétés complexantes des cyclodextrines

II.5.1. Formation des complexes d'inclusion

La formation des complexes d'inclusion (Figure II.3) peut se produire aussi bien en solution qu'à l'état solide. Un complexe d'inclusion est la résultante d'une multitude d'interactions mettant en jeu la CD, l'invité et le solvant visant à acquérir l'état thermodynamique le plus stable (Liu & Guo, 2002).

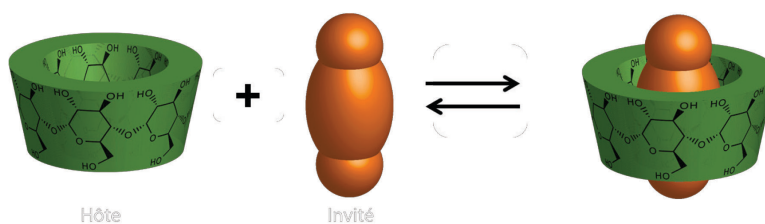


Figure II.3. Schéma général de la formation d'un complexe d'inclusion entre une molécule hôte de cyclodextrine et une molécule invitée.

En solution, la cavité de CD est occupée par des molécules d'eau. Cela crée un état énergétique défavorable du fait des interactions polaire-apolaire. Les molécules d'eau sont donc facilement remplacées par des molécules moins polaires. De plus, l'invité hydrophobe dissout au

préalable dans l'eau a une préférence la cavité des CDs. La formation d'un complexe d'inclusion CD/invité peut être décrit en 5 étapes (Marques, 2010).

1. Les molécules d'eau sont libérées de la cavité de la CD suite au rapprochement de l'invité de la CD. En conséquence, le degré de liberté des molécules d'eau expulsées augmente du fait de la diminution des interactions et du nombre de liaisons hydrogène avec la cavité.
2. L'invité hydrophobe se débarrasse de la couche d'hydratation qui l'enveloppe.
3. L'invité pénètre et occupe la cavité de CD formant ainsi un complexe d'inclusion stabilisé par des interactions de Van der Waals, interactions hydrophobes et/ou par des liaisons hydrogène.
4. Les molécules d'eau libres se réarrangent et forment des liaisons hydrogène entre elles.
5. La structure de l'eau est restaurée autour de l'invité non complexé.

L'exemple le plus simple et le plus fréquent est l'obtention d'un complexe hôte/invité de stœchiométrie 1:1. Des complexes de structure et stœchiométrie plus compliqués (2:1, 1:2, 2:2) peuvent également être obtenus (Landy *et al*, 2007) (Figure II.4).

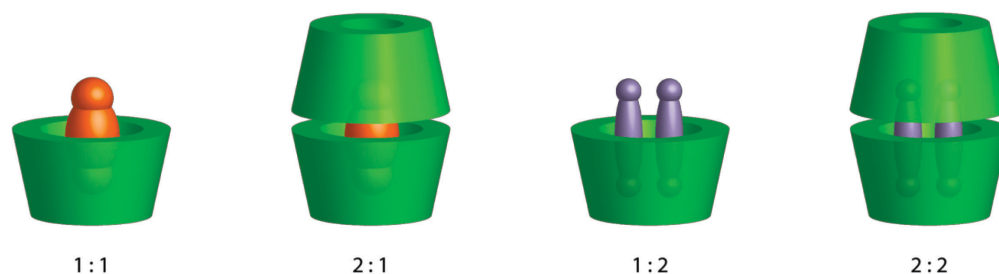


Figure II.4. Représentation des différentes stœchiométries des complexes d'inclusion (Landy *et al*, 2007).

En 1978, Komiyama et Bender furent les premiers à observer et interpréter que l'inclusion d'un invité dans une molécule hôte s'accompagnait d'un gain d'enthalpie et d'une perte d'entropie. Plus l'invité pénètre dans la cavité de la CD, plus la stabilité du complexe est importante ainsi que la variation d'enthalpie. Ce phénomène est d'autant plus vrai que l'invité est apolaire.

Le gain d'enthalpie a été expliqué comme suit (Komiyama & Bender, 1978; Liu & Guo, 2002):

1. La formation de liaisons faibles de type Van der Waals entre l'hôte et l'invité.
2. La formation de liaisons hydrogène entre l'invité encapsulé et la CD.

3. La libération des molécules d'eau ayant une énergie élevée lors de la complexation.
4. La libération de l'énergie de tension du macrocycle de la CD lors de la formation du complexe.

En 1982, Szejtli explique le gain d'enthalpie par l'arrivée spontanée de l'invité dans la cavité de la CD, expulsant ainsi les molécules d'eau hors de la cavité. En outre, il considère que bien que les liaisons de Van der Waals et hydrogène jouent un rôle majeur dans la complexation, ces liaisons restent faibles pour conférer à elles seules une stabilité suffisante au complexe. Il a donc rapporté la présence d'interactions stériques entre la CD et l'invité (Szejtli *et al*, 1982).

II.6. Les techniques de préparation des complexes d'inclusion CD/invité

Il existe diverses techniques de préparation des complexes d'inclusion. La méthode de préparation doit être choisie selon les applications envisagées car elle influence sur les caractéristiques physicochimiques et la dissolution du complexe. La préparation peut s'effectuer en milieu liquide ou solide en allant de simples méthodes de laboratoire jusqu'à l'échelle industrielle. Elle consiste généralement à dissoudre la CD en présence de l'invité puis laisser un équilibre s'établir. Le complexe sera par la suite récupéré sous forme solide. Les méthodes souvent utilisées sont les suivantes: (Cavallari *et al*, 2002; Del Valle, 2004; Hedges, 1998; Marques, 2010).

II.6.1. L'inclusion par cristallisation de la solution (co-précipitation)

Cette méthode est une des plus anciennes mais reste souvent utilisée. Elle consiste à agiter à une température entre 40 et 60°C une solution ou suspension de CD à laquelle l'invité (dissout dans l'eau ou un autre solvant) sera ajouté. Un chauffage peut s'installer, si l'invité le tolère. Ensuite, le refroidissement lent permet la co-précipitation du complexe formé. Le précipité est collecté par décantation, centrifugation ou filtration puis lavé dans le but d'éliminer l'excès d'invité non encapsulé. Les principaux inconvénients de cette technique sont liés surtout au lavage, la large quantité d'eau utilisée (vu la faible solubilité de la β -CD par exemple), le coût élevé des plusieurs étapes de préparation, ainsi que le faible rendement. Un additif (solvant organique, sel, polymère hydrosoluble) peut être ajouté au milieu de préparation pour optimiser le rendement de préparation (Loftsson *et al*, 2007).

II.6.2. L'inclusion par co-mélange (*co-grinding*)

Cette méthode présente plusieurs variantes (*damp/slurry/kneading/paste*) selon la quantité d'eau ou de solvants utilisée durant la préparation. Elle consiste à mélanger les molécules hôte et invité à des températures et temps différents suivant les caractéristiques de l'invité utilisé (Guimaraes *et al*, 2015; Tao *et al*, 2014).

II.6.2.1. L'inclusion en suspension (*slurry*)

Une solution aqueuse sursaturée en CD est préparée. La quantité de CD non dissoute peut arriver jusqu'à 50 à 60 %. A cette suspension et sous agitation est ajouté l'invité. Ce dernier va former avec la CD en solution des complexes d'inclusion. Comme la solution est saturée en CD, les complexes vont précipiter au fur et à mesure de leur formation, et les cristaux de CD vont se dissoudre et complexer davantage de molécules invitées. Le précipité (complexe d'inclusion) peut être collecté par précipitation, décantation ou filtration. L'optimisation du taux de complexation est possible par chauffage mais cela peut déstabiliser le complexe. La quantité d'eau et le temps indispensables à la complexation doivent être optimisés pour chaque invité.

II.6.2.2. L'inclusion par pétrissage (*paste/kneading*)

L'invité est ajouté à une pâte préparée en mélangeant, à l'aide d'un mortier, la CD avec de l'eau. Un pétrisseur est utilisé à l'échelle industrielle. Le temps nécessaire pour la complexation varie selon l'invité. La consistance de la pâte dépend de la quantité d'eau et de la nature de l'invité. Une fois récupéré et séché le complexe doit passer par une étape de broyage supplémentaire.

II.6.2.3. L'inclusion en méthode humide (*damp*)

La CD est mélangée avec l'invité en présence d'une faible quantité d'eau. Le mélange est ensuite placé dans un récipient hermétiquement scellé et chauffé jusqu'à 100°C. L'humidité provenant de l'eau d'hydratation de la CD et de l'invité peut arriver jusqu'à 20 à 25 % de la masse de la matière sèche. Selon la nature de l'invité et la quantité d'eau, la durée du mélange et du chauffage doivent être optimisées. Cette méthode nécessite un apport très important d'énergie et n'est conseillé qu'avec les invités stables à température élevée.

II.6.3. L'inclusion par extrusion

C'est une variante de l'inclusion par pétrissage du fait qu'elle se fait en mode continu. La CD, l'invité et l'eau sont mélangés et placés dans un extrudeur sous chauffage. Le degré de mélange, la température et le temps de chauffage sont contrôlés dans la cuve de l'extrudeur. Le complexe peut être séché par chauffage ou simple refroidissement. Du fait de la température générée, certains invités thermolabiles sont dégradés durant ce processus. L'intérêt de cette technique réside dans le fait que c'est un processus continu qui n'utilise qu'une faible quantité d'eau (Del Valle, 2004).

II.6.4. L'inclusion à sec

La complexation peut être envisagée par simple mélange des deux composés du complexe. Le temps nécessaire à la complexation varie selon l'invité qui est généralement une huile ou autre liquide. Cette méthode est généralement réalisée à température ambiante. Le principal avantage est que l'eau n'est utilisée que si un rinçage est nécessaire. Toutefois, des phénomènes non désirés peuvent se présenter tels que la formation de croûtes sur les poudres et la complexation partielle si le degré du mélange n'est pas suffisant (Del Valle, 2004).

II.6.5. L'inclusion par neutralisation

Cette technique est souvent utilisée dans le cas d'invités ionisables. Un invité acide est ainsi dissout dans un milieu aqueux alcalin contenant la CD et vice versa. Le changement de pH induit la diminution de la solubilité de l'invité et la formation de complexes solides (Choi *et al*, 2001).

II.6.6. L'inclusion par co-évaporation

Elle consiste à mélanger la CD et l'invité pendant un certain temps nécessaire pour avoir une complexation en présence d'un autre solvant à la même température. Puis le complexe solide est récupéré par co-évaporation des solvants présents (Yurtdas *et al*, 2011).

II.6.7. Séchage par atomisation/ pulvérisation (*spray drying*)

Les différents composants (CD, invité et solvant) sont mélangés puis les complexes sont pulvérisés. Une précipitation peut être provoquée et contrôlée pour éviter que de grandes

particules bloquent la buse du pulvérisateur. Ce processus n'est pas conseillé pour les invités volatils et thermolabiles du fait que la température peut atteindre 50-70°C durant le séchage (del Toro-Sanchez *et al*, 2010).

II.6.8. Séchage par lyophilisation (*freeze drying*)

La lyophilisation peut être utilisée pour le séchage des complexes suite à la dissolution d'une quantité définie de CD et d'invité dans l'eau sous agitation constante. La faible température réduit les pertes, ce qui est intéressant dans le cas de composés volatils et/ou thermolabiles (Hill *et al*, 2013; Yuan *et al*, 2014).

II.6.9. L'inclusion au CO₂ supercritique

Au delà de 31,4°C et 73,8 bars, le CO₂ entre dans un état de matière appelé supercritique. Le CO₂ supercritique présente un pouvoir solvant et a été proposé pour la préparation des complexes l'inclusion de CDs avec des molécules aromatiques en 1990 (Kamihira *et al*, 1990). Cette technique reste cependant peu utilisée pour les composés volatils tels que les HEs et leurs constituants bien que les complexes obtenus présentent une bonne dissolution et une meilleure disponibilité que le mélange physique. Cette technique présente les avantages d'être simple, reproductible et économique (aucun solvant n'est utilisé) (Locci *et al*, 2004). L'application de cette technique reste pour l'instant limitée à l'échelle expérimentale et cela est principalement dû au prix élevé de l'appareil.

II.6.10. L'inclusion par microondes

Cette méthode permet d'atteindre rapidement la température nécessaire pour la formation du complexe d'inclusion tout en gardant une bonne uniformité des propriétés du complexe. Le temps de réaction ne dépasse généralement pas 90 s et une température de 60°C (à 150 W). Des valeurs plus importantes peuvent être utilisées pour des invités moins labiles.

II.6.11. Effets de la technique de préparation des complexes d'inclusion

Dans le Tableau II.3 sont présentés quelques exemples de complexes de constituants d'HEs avec les CDs obtenus par différentes méthodes de préparation. Il faut noter que le rendement et

l'efficacité d'encapsulation varient largement selon la technique de préparation appliquée. Des exemples de la littérature montrent une variabilité dans l'efficacité d'encapsulation, le rendement et les caractéristiques du complexe obtenu en fonction de la méthode utilisée (Mohit *et al*, 2011; Yurtdas *et al*, 2011).

Tableau II.3. Exemples de complexes d'inclusion entre les CDs et des composants d'HEs obtenus par différentes méthodes de préparation.

Composant d'HE	CD	Méthode de préparation
Acétate de benzyle ^a	HP-β-CD	Lyophilisation
Acétate de linalyle ^b	β-CD	Co-précipitation
Benzaldéhyde ^b	β-CD	Co-précipitation
Benzoate d'éthyle ^c	HP-β-CD	Lyophilisation
Camphène ^d	β-CD	Co-précipitation
Carvacrol ^e	β-CD	CO ₂ supercritique
Cinamaldéhyde ^{f,g}	β-CD	Lyophilisation, co-précipitation
<i>p</i> -Cymène ^h	β-CD	Pétrissage
Eucalyptol ⁱ	HP-β-CD	Lyophilisation
Eugénol ^{e,f,j}	α-, β-, HP-β-, γ-CD	Lyophilisation, CO ₂ supercritique
Fenchène ^d	β-CD	Co-précipitation
Géraniol ^{l,k}	β-, HP-β-CD	Pétrissage, suspension, lyophilisation
Hydroxycitronellal ^b	β-CD	Co-précipitation
Isopulégol ^l	β-CD	Co-précipitation
Limonène ^{b,i}	β-, HP-β-CD	Co-précipitation, lyophilisation
Linalol ^{a,b,i}	α-, β-, HP-β-CD	Co-précipitation, lyophilisation
Menthol ^b	β-CD	Co-précipitation
α-Pinène ^l	HP-β-CD	Lyophilisation
β-Pinène ^l	HP-β-CD	Lyophilisation
Pulégone ^l	HP-β-CD	Lyophilisation
α-terpinéol ^{m,n}	β-, HP-β-CD	Co-précipitation, lyophilisation
Thymol ^{e,g,i}	β-, HP-β-CD	Co-précipitation, CO ₂ supercritique, lyophilisation
Vanilline ^b	β-CD	Co-précipitation

^aNumanoglu *et al*, 2007; ^bRivis *et al*, 2008; ^cYuan *et al*, 2014; ^dCeborska *et al*, 2013a; ^eLocci *et al*, 2004; ^fHill *et al*, 2013; ^gPonce Cevallos *et al*, 2010; ^hDe Souza Siqueira Quintans *et al*, 2013; ⁱKfoury *et al*, 2014; ^jNuchuchua *et al*, 2009; ^kMenezes *et al*, 2012; ^lCeborska *et al*, 2013b; ^mDos Santos *et al*, 2012; ⁿMazzobre *et al*, 2011.

Le Tableau II.4 illustre un exemple pour le complexe d'inclusion β-CD/fluconazole préparé selon différentes méthodes (Yurtdas *et al*, 2011). Pour une meilleure performance, les travaux récents combinent plusieurs méthodes pour la préparation d'un même complexe d'inclusion. Comme par exemple, la combinaison de l'évaporation d'une émulsion de solvants et la

lyophilisation (Zhang *et al*, 2014), la combinaison de la méthode de lyophilisation et la pulvérisation pour l'encapsulation des arômes (Hundre *et al*, 2015).

Tableau II.4. Exemples de la littérature montrant l'influence de la méthode de préparation sur le complexe obtenu (Yurtdas *et al*, 2011).

Méthode de préparation	Rendement (%)	Solubilité aqueuse du complexe (mg/ml)	Quantité d'invité dans le complexe (mg)
Lyophilisation	69,69±6,24	8,36±0,03	25,47±0,74
Pulvérisation	34,25±7,80	7,80±0,06	22,22±0,26
Co-évaporation	93,94±0,92	7,89±0,52	24,53±0,79
Pétrissage	94,12±0,22	8,27±0,007	21,98±0,74

II.7. Caractérisation des complexes en solution

Lors de la caractérisation d'un complexe d'inclusion, plusieurs paramètres sont à considérer tels que la stoechiométrie du complexe, sa nature (association ou inclusion), son modèle (bi- ou multimodalité) et sa géométrie, la conformation de l'invité, l'enantiodifférentiation, les paramètres thermodynamiques et le calcul des constantes de formation (K_f). Nous présentons par la suite l'importance et le rôle de ces paramètres dans la caractérisation des complexes d'inclusion ainsi que les techniques couramment employées dans la détermination de ces derniers.

II.7.1. Les constantes de formation (K_f)

Lors de l'étude des complexes d'inclusion avec les CDs, la stabilité du complexe est exprimée en terme de constante de stabilité ou de formation (K_f). La connaissance des K_f des complexes CD/invité est importante, car elle permet de calculer les concentrations des espèces à l'équilibre en solution ou lorsque les complexes solides sont dissouts en milieu aqueux, que ce soit dans les applications pharmaceutiques, cosmétiques ou alimentaires. Malgré la grande variété de méthodes utilisées pour la détermination des K_f (Mura, 2014), les techniques appliquées dans le cas des HEs et de leurs constituants restent limitées vu leur faible solubilité dans l'eau. Ainsi, les principales techniques appliquées sont l'HPLC (Moeder, 1996), l'ITC (Liu *et al*, 2004), la spectroscopie UV-visible (Decock *et al*, 2006; Tanemura *et al*, 1998), la méthode de solubilité (Demian, 2000), la fluorescence (Kfoury *et al*, 2014; Zhan *et al*, 2008) ou encore

l'espace de tête statique « *headspace* » couplé à la chromatographie en phase gazeuse (HS-CG) (Ciobanu *et al*, 2012; 2013a; 2013b; Kfoury *et al*, 2014).

Dans notre travail, nous avons utilisé l'HS-CG, la spectroscopie UV-visible par compétition ainsi que la méthode de phase de solubilité pour la détermination des K_f .

II.7.1.1. L'espace de tête couplé à la chromatographie en phase gazeuse

La technique HS-CG permet de calculer les K_f des complexes CD/invités volatils. Elle consiste à suivre l'évolution du pic chromatographique de l'invité volatil en présence de CD après un équilibre permettant son partage entre la phase aqueuse et la phase gazeuse (Figure II.5). La particularité de cette technique se base sur le fait qu'elle permet de suivre l'évolution du pic chromatographique d'un composé volatil présent dans l'espace de tête d'une matrice non volatil contenant au préalable ce composé. L'efficacité de cette méthode a été démontrée dans de nombreuses études (Blach *et al*, 2008; Ciobanu *et al*, 2013a; Fourmentin *et al*, 2007; Wu *et al*, 1999).

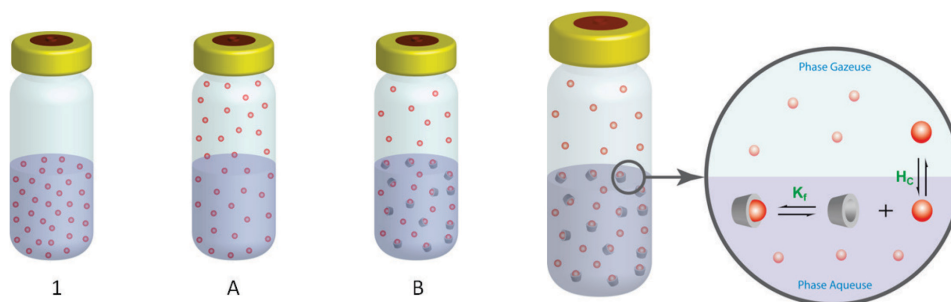


Figure II.5. Schéma montrant le principe de la technique d'espace de tête utilisée pour la détermination de k_f du complexe CD/invité: 1) introduction de l'invité dans la phase aqueuse, A) un équilibre s'établit entre les concentrations de l'invité dans la phase gazeuse et l'eau ou B) la phase gazeuse et une solution de CD.

II.7.1.2. La spectroscopie UV-Visible et la méthode par compétition

La spectroscopie UV-Visible peut être utilisée pour l'étude des complexes d'inclusion des CDs et notamment pour la détermination des K_f . La caractérisation des complexes peut être menée par une méthode directe ou par compétition. La méthode directe consiste à observer les variations spectrales d'une molécule invitée en fonction de la concentration en CD. La CD ne

disposant pas elle-même de chromophore, cette méthode ne s'applique qu'aux invités possédant un chromophore. Le principe de la méthode indirecte ou par compétition consiste à observer les variations spectrales d'une molécule tierce désignée par le terme compétiteur lors de l'addition de CD puis l'invité (Landy *et al*, 2000; 2007). L'ajout d'une quantité connue d'invité à la solution contenant la CD et le compétiteur provoque une perturbation de l'équilibre présent et par conséquent une différence spectrale de l'absorption du compétiteur en absence et en présence de l'invité. Cette différence spectrale étant dépendante des concentrations totales de chaque molécule, mais également des affinités relatives des complexes, elle permet d'évaluer la stabilité du composé d'inclusion CD/invité. Le choix du compétiteur est d'une grande importance. Aucune interaction ne doit exister entre l'invité et le compétiteur qui doit également présenter une différence entre l'absorptivité de sa forme libre et de sa forme encapsulée. C'est le cas de l'orange de méthyle (MO), indicateur coloré (Figure II.6). Cette technique exige la caractérisation préalable du complexe CD/compétiteur par une simple titration (méthode directe).

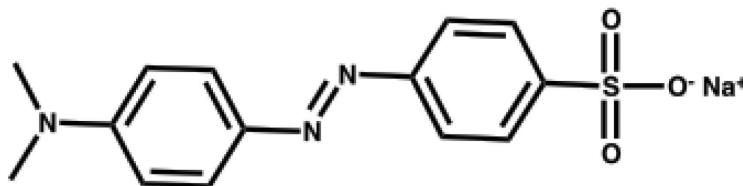


Figure II.6. Structure de l'Orange de Méthyle (MO).

L'avantage de cette technique est qu'elle est applicable aux substances ne contenant pas de chromophore et permet le travail en série. A titre d'exemple, les K_f des complexes d'inclusion de quatre molécules aromatiques avec la β -CD et ses dérivés ont été déterminées en utilisant la méthode de compétition (Decock *et al*, 2006).

II.7.1.3. Le diagramme de solubilité

Cette méthode de solubilité est connue sous le nom de la méthode Higuchi et Connors (Higuchi & Connors, 1965). Les diagrammes ou isothermes de solubilité sont réalisés en mesurant la concentration maximale que le composé peut atteindre dans une solution aqueuse de CDs. La molécule invitée est placée en excès dans des solutions de concentrations croissantes de CD, à une température donnée. Après agitation puis filtration, la quantité totale du composé

solubilisée est mesurée. Un diagramme de solubilité est donc réalisé en représentant sur un graphique la solubilité apparente du composé en fonction de la concentration totale en CD. Différents types de courbes caractérisant les interactions CD/invité peuvent être ainsi obtenues (Figure II.7).

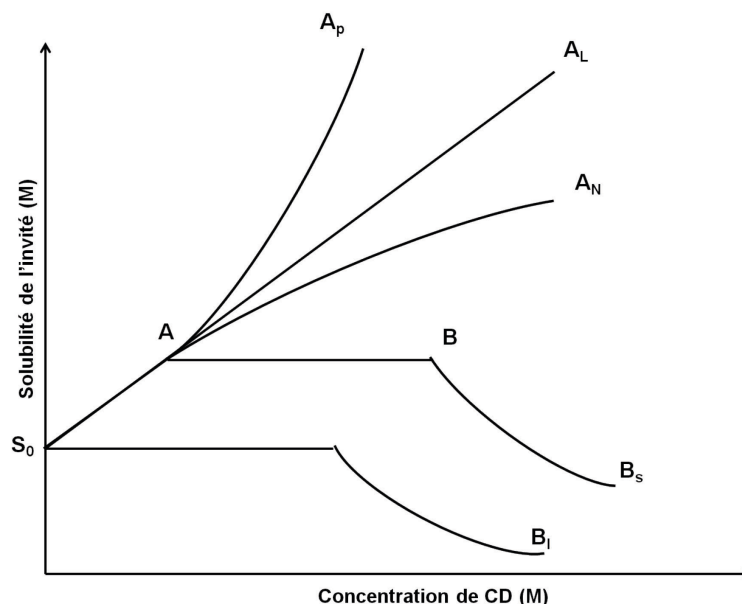


Figure II.7. Les diagrammes de solubilité selon la classification de Higuchi et Connors (Higuchi & Connors, 1965).

Le type A est observé lorsque la solubilité de l'invité augmente d'une manière continue avec la concentration en CD indiquant que le complexe formé présente une solubilité au moins équivalente à celle de la CD. Le profil parfaitement linéaire (type A_L) est généralement attribué au complexe de stœchiométrie 1:1. Si le complexe est supérieur à l'ordre 1 par rapport à la CD, l'augmentation de la concentration de CD aboutit à un plus fort accroissement de solubilité du fait de la formation simultanée de complexes de plus hautes stœchiométries (2:1, 3:1, etc.). Dans ce cas, un diagramme positif de type A_p est obtenu. Des diagrammes négatifs de type A_N peuvent être observés mais leur interprétation est délicate (Loftsson *et al*, 2005). Le type B est obtenu lorsque le complexe présente une solubilité limitée. En d'autres termes, sa solubilité est inférieure à celle de la CD. Le type B_s désigne les diagrammes de phase de solubilité où la solubilité du complexe est supérieure à celle de l'invité seul. Le complexe atteint sa solubilité maximale au point A et au delà du point B l'ajout de CD conduit à la précipitation du complexe. Dans le cas du diagramme B_l , le complexe formé est moins soluble que l'invité et l'ajout de CD

n'entraîne aucune augmentation de solubilité. Les diagrammes de type A_L et la partie linéaire des diagrammes B_S permettent de déterminer la stabilité du complexe (1:1) calculée en termes de K_f selon l'équation suivante :

$$K_f = \frac{\text{Pente}}{S_0 (1 - \text{Pente})} \quad \text{II.1}$$

où S₀ est la solubilité intrinsèque de l'invité (en absence de CD) et Pente est la pente du diagramme de phase de solubilité.

En dehors du calcul des K_f, les diagrammes de solubilité servent également à déterminer l'efficacité de complexation (CE) selon l'équation suivante :

$$CE = K_f \times S_0 = \frac{\text{Pente}}{1 - \text{Pente}} \quad \text{II.2}$$

Ce paramètre permet d'évaluer la capacité de solubilisation de CD vis-à-vis du composé étudié ainsi que de définir le rapport optimal CD:invité pour la préparation de complexes sous forme solide (Loftsson *et al*, 2007). L'avantage du CE est que c'est un facteur indépendant des fluctuations causées par les composés extrêmement insolubles dans l'eau lors de la détermination de leur solubilité intrinsèque.

Le CE peut être utilisé pour calculer le rapport molaire optimal pour la préparation des complexes dans un milieu saturé en invité. Le rapport molaire invité:CD est calculé selon la relation suivante :

$$(\text{invité} : \text{CD}) = \left(1 : 1 + \frac{1}{\text{CE}} \right) \quad \text{II.3}$$

La relation entre l'augmentation du volume de la formulation (utilisé surtout en industrie pharmaceutique), le CE et les masses molaires de l'invité et de la CD est définie comme suit :

$$\text{Augmentation de la formulation} = \frac{M_{\text{CD}}}{M_{\text{invité}}} \left(1 + \frac{1}{\text{CE}} \right) \quad \text{II.4}$$

Avec M_{CD} et M_{invité} : les masses molaires de la CD et de l'invité, respectivement.

II.7.2. les paramètres thermodynamiques

La Calorimétrie de Titration Isotherme (ITC) est technique polyvalente présentant l'avantage de mesurer directement, en plus de la K_f , la chaleur libérée lors de l'inclusion et donc l'enthalpie d'inclusion. Il sera possible par la suite de remonter aux grandeurs thermodynamiques du système. Nous obtenons alors les valeurs d'enthalpie, d'entropie et d'énergie libre, ainsi que la K_f et la stœchiométrie du complexe. Contrairement aux autres techniques, l'ITC a été conçue et développée spécifiquement pour la caractérisation des interactions moléculaires (Bouchemal & Mazzaferro, 2012).

II.7.3. La géométrie et la structure du complexe

La Résonnance Magnétique Nucléaire (RMN) dépasse le simple esprit analytique pour arriver à la détermination de la structure du complexe. L'environnement magnétique des atomes des molécules intervenant dans le processus de complexation se trouve modifié. Ces modifications peuvent être mesurées par spectrométrie RMN (Lis-Cieplak *et al*, 2014). En effet, la variation de la fréquence de résonance des protons de la cavité de la CD (H-3 et H-5) couplée à celle des protons de l'invité met en évidence la formation d'un complexe mais permet également d'en proposer la géométrie. Les signaux des déplacements chimiques des protons H-3 et H-5 de la CD sont généralement décalés vers les champs forts. Ce déplacement est induit par l'effet anisotropique suite à l'inclusion des entités riches en électrons π de l'invité dans la cavité hydrophobe de la CD. Le déplacement vers les champs faibles des signaux des protons de l'invité impliqués dans la complexation est souvent dû au changement de polarité de son environnement (Ribeiro *et al*, 2005).

De plus, suite à l'encapsulation dans la cavité de la CD, la mobilité de l'invité est réduite ce qui entraîne une diminution des temps de relaxation pouvant être mesuré par la ^1H RMN (mettant en pratique une séquence appelée inversion-récupération) (Karoyo *et al*, 2013). La ^1H RMN a été utilisée pour étudier la complexation du linalol par l'HP- β -CD (Numanoglu *et al*, 2007). La technique ROESY est appliquée pour observer les interactions dipolaires de protons proches dans l'espace ($<4 \text{ \AA}$). Les interactions entre les protons de la cavité de la CD (H-3 et H-5) et l'invité confirment la présence d'un complexe d'inclusion. Généralement, cette technique est complémentaire à la ^1H RMN qui permet de confirmer que les variations des déplacements

chimiques sont bien dues à une réelle inclusion et ne résultent pas de simples interactions de surface. Par conséquent, elle permet de proposer une géométrie du complexe (Pirna *et al*, 2014). Une molécule invitée non symétrique peut s'inclure de différentes façons dans la cavité de CD et nous assistons donc à un phénomène de bi- ou de la multimodalité. Ce phénomène est généralement accompagné d'une reconnaissance entre les groupes fonctionnels de l'invité et les hydroxyles de la CD. Le mode d'inclusion de l'acide férulique et de l'acide caféique dans la cavité de l'HP- β -CD a été proposé suite à une étude RMN ROESY (Zhang *et al*, 2009a ; 2009b).

II.8. Caractérisation des complexes à l'état solide

II.8.1. La calorimétrie différentielle à balayage (DSC)

La DSC est utilisée pour la mise en évidence de la formation des complexes d'inclusion sous forme solide. Suite à la complexation, les propriétés thermodynamiques des composés changent permettant de deceller la modification ou la disparition du pic caractéristique de l'invité correspondant à son évaporation ou sa fusion suite à l'encapsulation (Takahashi *et al*, 2012). La DSC a été largement utilisée dans la littérature pour la caractérisation des complexes entre les CDs et les HEs comme par exemple l'HE de coriandre ou de sauge (Hadaruga *et al*, 2005, 2007).

II.8.2. La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)

La spectrophotométrie FTIR est utilisée depuis de nombreuses années pour identifier directement la formation de complexes d'inclusion CD/invité. Cette méthode donne rapidement un aperçu sur l'inclusion d'un invité dans la cavité de CD, en comparant le spectre du complexe à ceux de l'invité et de la CD en question. Généralement, les bandes de CD ne subissent qu'un simple changement suite à la complexation, alors que les bandes correspondant à la partie de l'invité transloquée dans la cavité de la CD seront facilement masquées ou altérées par celles du spectre de la CD (Nicolescu *et al*, 2010). Ces modifications sont indicatives de l'inclusion et sont dues à la perte de la vibration et de la transition de l'invité à cause du changement de son environnement et de ses interactions avec la CD (Ayala-Zavala *et al*, 2008; Takahashi *et al*, 2012). De plus, les spectres FTIR donnent des informations sur l'implication des hydrogènes dans les interactions entre les groupes fonctionnels. Les groupes fonctionnels absorbent à des fréquences relativement constantes, donnant ainsi la possibilité d'obtenir des informations

structurales détaillées sur les molécules étudiées à partir de leurs spectres IR. La FTIR a été utilisée, par exemple, pour confirmer l'inclusion du géraniol dans la β -CD (Menezes *et al*, 2012).

II.8.3. La diffraction des rayons X (DRX)

La DRX permet de détecter les changements dans le réseau cristallin lors de la complexation. Nous observons généralement, une disparition ou une diminution des pics caractéristiques de l'invité reflétant la perte de cristallinité associée à son inclusion dans la CD. De plus, la DRX permet de définir l'orientation que prennent les dimères de CD. Cette orientation est différente suivant l'invité et la nature de CD. Les trois orientations les plus probables sont : « *head-head* », « *head-tail* » et « *tail-tail* » (Figure II.8). Il a été démontré par exemple que les dimères des complexes β -CD/menthol s'organisaient en « *head-head* » avec une orientation « *head-tail* » du menthol (Ceborska *et al*, 2012).

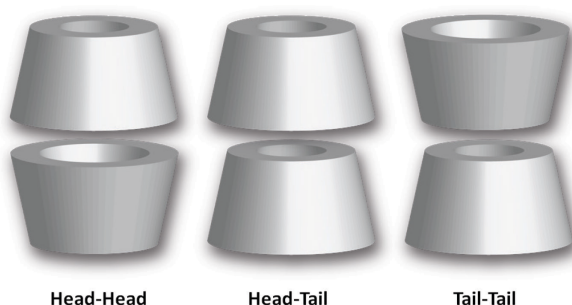


Figure II.8. Représentation de trois orientations possibles des cyclodextrines.

II.8.4. La multiple extraction

La libération des invités volatils des complexes d'inclusion peut être suivie en utilisant le mode «extraction multiple» de l'espace de tête (Multiple Headspace Extraction, MHE) (Kolb & Ettre, 2006). C'est une technique d'extraction dynamique en série. Elle consiste à effectuer une suite d'échantillonnage pour un même échantillon mis en solution ou sous forme solide (Figure II.9).

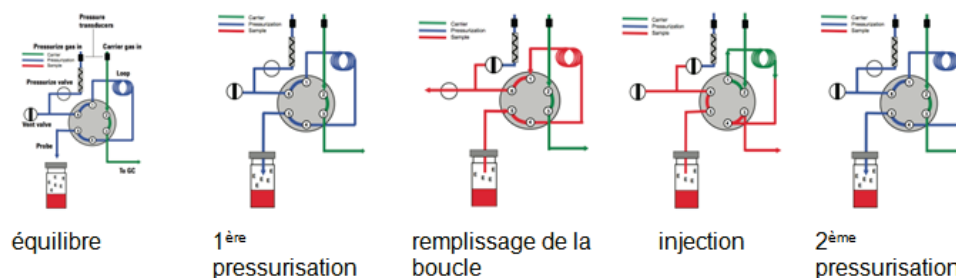


Figure II.9. Principe de l'extraction multiple de l'espace de tête (MHE).

Au fur et à mesure des extractions, la quantité de l'invité volatil présent dans l'espace de tête diminue jusqu'à devenir nulle, de même pour les aires des pics chromatographiques correspondants. La somme des aires obtenues sera donc égale à la quantité d'invité présent dans le complexe. La MHE permet donc l'illustration du profil de libération du produit volatil ainsi que la détermination de sa quantité dans le complexe d'inclusion solide (Ciobanu *et al*, 2013b).

II.9. Modélisation moléculaire

La modélisation moléculaire consiste à simuler la géométrie et les propriétés (énergétiques, électroniques, thermodynamiques, etc.) des atomes individuels comme des édifices moléculaires ou supramoléculaires par des traitements mathématiques et informatiques. Dans le cas de complexes hôte/invité, la modélisation moléculaire sert à mieux comprendre les mécanismes et énergies d'inclusion régissant la formation et la stabilité des complexes. Elle permet également d'observer la complémentarité stérique entre la CD et les invités (Cai *et al*, 2011; Castro & Barbiric, 2006).

Les méthodes de modélisation moléculaire sont classées en trois catégories :

a) Les méthodes quantiques (MQ) : méthodes purement théoriques, *ab-initio*, ou semi-empiriques basées sur le calcul des orbitales moléculaires et la résolution de l'équation de Schrödinger.

b) La mécanique moléculaire (MM) : basée sur un ajustement empirique, permettant de calculer l'énergie relative de la molécule (énergie conformationnelle) au moyen d'approximations. La simplification des calculs qui en résultent permet de travailler sur des grandes molécules.

c) La dynamique moléculaire : (qui est plutôt une application qu'une méthode) : consiste à observer la déformation structurale d'une molécule après apport énergétique et calculer les

énergies potentielles, cinétiques et totales du mouvement, le plus souvent à partir des énergies de la mécanique moléculaire, en appliquant les lois de la mécanique classique.

La modélisation moléculaire consiste donc en un jeu de fonctions et de paramètres nécessaires au calcul de toutes les énergies décrivant un champ de forces. Dans notre cas, nous avons mené des recherches conformationnelles sur les complexes d'inclusion, après modélisation des invités et de la CD, par une procédure de docking consistant en l'approche de l'invité de la cavité de la CD. Ces simulations sont réalisées en mécanique moléculaire (champ de forces MMFFs, avec simulation du solvant GB/SA, logiciel Maestro), par des recherches de type Monte Carlo.

II.10. Toxicité et métabolisme des cyclodextrines

Les CDs ne sont pas toxiques ; elles s'hydrolysent, généralement, dans l'organisme pour libérer du glucose. Quelques paramètres pharmacocinétiques des CDs sont listés dans le Tableau II.5.

Tableau II.5. Paramètres pharmacocinétiques des cyclodextrines natives et modifiées.

	α -CD	β -CD	γ -CD	HP- β -CD	RAMEB	SBE- β -CD
Voie d'administration	Orale, topique, parentérale	Orale, topique	Orale, topique, parentérale	Orale, topique, parentérale	Orale, topique	Orale, topique, parentérale
Homme						
*DJA ^{a,b} (g)	1,4	0,35	10	16	-	14
Rat						
*DL ₅₀ ^{c,d} (g/kg)	10	19	8	2	8	>10
"DL ₅₀ ^{c,d} (g/kg)	0,5-0,75	0,45-0,79	4	10	1,5-2,1	>15
*Biodisponibilité ^{e,f}	1%	0,6%	0,02%	<3%	<12%	1,64%
"t _{1/2} ^{e,d} (min)	25	21,6	20	23,9	18	18
"V _D ^e (l/kg)		0,2		0,19	-	0,3
"F inchangée urine ^f	90%	90%	90%	90%	95%	-
"Clairance ^e (ml/min/kg)	-	7,53	-	7,2	-	9,8

DJA: Dose Journalière Admissible; *: administration orale; F: Fraction; " : administration IV. ^aAntlsperger & Schmid, 1996; ^bIrie & Uekama, 1997; ^cDel Valle, 2004; ^dBrewtser & Loftsson, 2007; ^eStella & He, 2008; ^fLoftsson & Brewtser, 2010; ^gKurkov & Loftsson, 2013. Pharmacopée: Europe 5^{ème} édition; USA 28^{ème} édition.

II.10.1. L' α -cyclodextrine

Aucun effet notoire n'a été constaté suite à une prise orale d' α -CD (Lina & Bar, 2004). Cette dernière est métabolisée par la flore intestinale au niveau du colon et du caecum. Chez le rat, suite à une administration orale, 60% de la dose administrée est éliminée sous forme de CO₂ alors que le reste est excrété dans les selles et l'urine. Les CDs sont résistantes à l'action des β -amylases, néanmoins elles peuvent être dégradées par les α -amylases à une vitesse réduite (Szejtli, 1988). Suite à administration par voie IV, l' α -CD est éliminée pour 90% par voie rénale sous forme intacte. Aucun effet embryotoxique ou tératogène de l' α -CD n'est observé chez la lapine même pour une dose de 13 g/kg du poids corporel/jour. De plus, aucune malformation n'a été constatée chez les lapereaux ainsi qu'aucune variation de la capacité de reproduction chez la lapine (Waalkens-Berendsen & Bar, 2004). La dose maximale d' α -CD se trouvant dans un médicament commercialisé est de 1,3 mg/jour pour une injection IV (Brewster & Lofsston, 2007).

II.10.2. La β -cyclodextrine

L'absorption de la β -CD dans le tractus intestinal est négligeable (Irie & Uekama, 1997). Cette CD est dégradée par les bactéries colonisant le colon et le caecum (Irie & Uekama, 1997). Toutefois, la β -CD ne peut pas être administrée en forte concentration car sa fermentation peut provoquer des diarrhées. La β -CD est fréquemment utilisée dans des médicaments à administration orale, rectale et topique. Son administration parentérale est exclue car elle peut provoquer une néphrotoxicité due à sa possible cristallisation vu sa faible solubilité aqueuse (1,85 mg/ml) ou à l'extraction du cholestérol membranaire dans les tissus rénaux (Frank *et al*, 1976).

II.10.3. La γ -cyclodextrine

La γ -CD peut être hydrolysée par les amylases salivaires et pancréatiques. Dans le tractus intestinal et suite à une administration orale, la γ -CD est rapidement et totalement métabolisée en glucose alors qu'elle est résistante après une administration IV. La γ -CD est la moins toxique des CDs. Toutefois, sa capacité de complexation est généralement la plus faible en comparaison avec

les autres CDs natives. La γ -CD, l'HP- β -CD et la SBE- β -CD sont citées dans la liste FDA (Food and Drug Administration) des excipients inactifs (Kurkov & Loftsson, 2013).

II.10.4. Les cyclodextrines méthylées

Chez le rat, la biodisponibilité de la RAMEB suite à une administration orale est de 5% environ et plus de 90% de la dose administrée est excrétée sans modification dans les selles. Cependant, les CDs méthylées induisent des effets toxiques et augmentent l'hémolyse après une administration par voie parentérale (Irie & Uekama, 1997). Dans un modèle de cellules épithéliales buccales *in vitro*, la RAMEB à 10% induit des effets inflammatoires et cytotoxiques alors qu'elle est tolérée à des doses de 2 et 5% et qu'elle n'induit aucune lésion tissulaire même après 5 jours de traitement (Boulmedarat *et al*, 2005). Au contraire, une étude a montré une induction d'apoptose dans les cellules nerveuses à des faibles doses (0,25%) (Ulloth *et al*, 2007).

II.10.5. L'hydroxypropyle- β -cyclodextrine

L'HP- β -CD est plus hydrosoluble et moins toxique que la β -CD native. L'HP- β -CD peut être administrée par voie parentérale en toute innocuité. Elle est incluse dans diverses formulations orales commercialisées, à un dosage supérieur à 8g/jour (Gould & Scott, 2005). Ce dérivé est très bien toléré chez l'homme. Toutefois, une diarrhée peut s'installer suite à un traitement utilisant des doses allant de 16 à 24 g/jour au delà de 14 jours (Brewster & Loftsson, 2007). Chez l'homme, suite à une administration orale, la biodisponibilité de l'HP- β -CD est de 0,5 à 3,3%, avec 50 à 65% de la dose excrétée sans dégradation dans les selles, le reste étant métabolisé par la flore intestinale. Après injection IV, l'HP- β -CD est complètement éliminée par filtration glomérulaire avec une clairance rénale entre 110 et 130 ml/min indépendamment de la dose administrée. La valeur de clairance rénale de l'HP- β -CD est cohérente avec la vitesse de filtration glomérulaire (125 ml/min) confirmant son élimination par filtration glomérulaire (Gould & Scott, 2005; Irie & Uekama, 1997). Par conséquent, l'administration de l'HP- β -CD n'est pas autorisée chez les patients souffrant d'une insuffisance rénale sévère (clairance rénale <10ml/min). De plus, la majorité d'une dose injectée directement dans le cerveau du rat sera totalement éliminée dans les 4 h suivantes. L'HP- β -CD passe du cerveau vers la circulation systémique et sera excrétée dans l'urine (Irie & Uekama, 1997). Chez la souris, l'administration de doses orales à 5 g/kg/jour ne montre aucune carcinogénicité. L'HP- β -CD peut se trouver à un dosage supérieur à 16 g/jour dans des solutions injectables commercialisées

et c'est ce dérivé ainsi que le SBE- β -CD sont les deux meilleures CDs pour une administration parentérale (Gould & Scott, 2005; Stella & He, 2008). Le Tableau II.6 montre quelques paramètres pharmacocinétiques de l'HP- β -CD chez l'homme.

Tableau II.6. Paramètres pharmacocinétiques de l'HP- β -CD chez l'homme suite à une administration orale ou intraveineuse.

	Biodisponibilité orale ^a	F* dans l'urine ^b	F* dans les selles ^a	t _{1/2} ^c (h) IV	V _D ^d (l/kg) IV	Clairance ^e (ml/min) IV
HP- β -CD	0,3-3,3%	>93%	50-65%	1,9	222-253	110-130

F* : Fraction inchangée. ^aBrewtser & Loftsson, 2007; ^bKurkov & Loftsson, 2013; ^cLoftsson & Brewtser, 2010 ; ^dStella & He, 2008; ^eIrie & Uekama, 1997.

II.10.6. La sulfobutyléther- β -cyclodextrine

Il a été démontré que la SBE- β -CD pouvait être administrée en toute innocuité par voie parentérale et orale (Irie & Uekama, 1997). Cette CD est déjà utilisée dans les formulations parentérales où elle peut être administrée jusqu'à une dose de 14 g/jour (Kurkov & Loftsson, 2013). L'un des médicaments contenant la SBE- β -CD est le voriconazole (Vfend®, solution parentérale). Les patients traités par le voriconazole par voie intraveineuse peuvent souffrir d'une accumulation de sodium provenant de la SBE- β -CD. Cependant les doses accumulées sont faibles et ne présentent aucune toxicité (Von Mach *et al*, 2006). Comme l'HP- β -CD, la SBE- β -CD est éliminée par filtration glomérulaire et se trouve intacte dans l'urine. Ces deux CDs ont une clairance élevée donc une demi-vie très faible (Stella & He, 2008). Chez les individus ne souffrant d'aucune insuffisance rénale, 90% et 99% de la quantité de CD sont excrétées après 6 et 12 h d'administration parentérale, respectivement (Loftsson & Brewter, 2010).

II.11. Interactions des cyclodextrines avec les membranes

L'effet des CDs sur différents types de membranes cellulaires telles que des érythrocytes humaines (Irie *et al*, 1982; Ohtani *et al*, 1989), fibroblastes humaines (Pitha *et al*, 1988), cellules intestinales humaines (Hovgaard & Brondsted, 1995), membranes vésiculaires (Nakanishi *et al*, 1992), cellules murines leucémiques P388 (Leroy-Lechat *et al*, 1994) et cellules bactériennes d'*E. coli* (Bar & Ulitzur, 1994) a été étudié.

La cytotoxicité induite par les CDs (à fortes concentrations) est due à l'extraction des composants vitaux (cholestérol et phospholipides) et à la perméabilisation membranaire indépendamment du type cellulaire (Figure II.10).

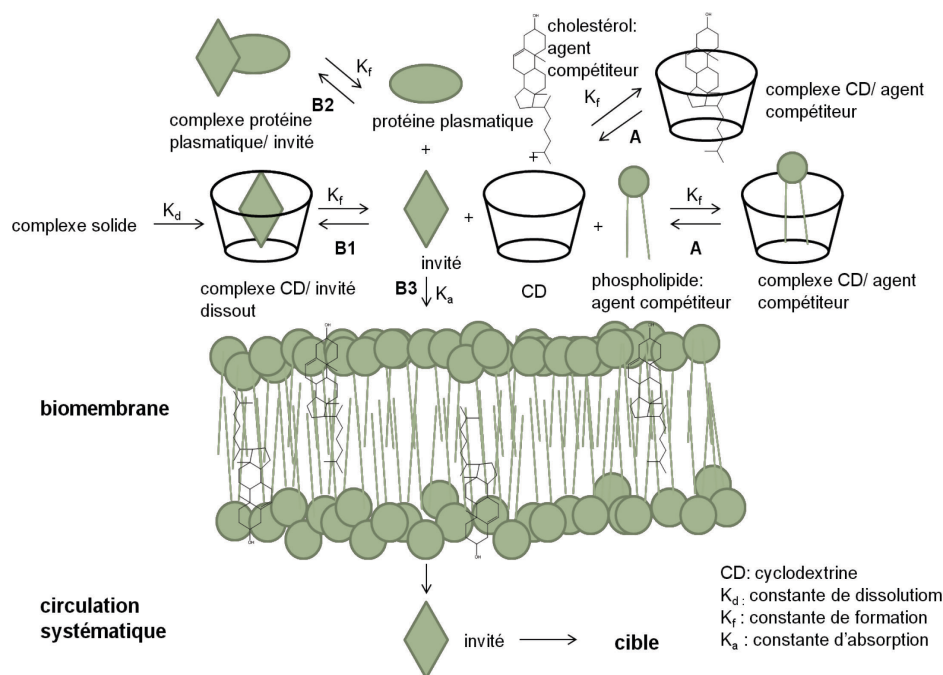


Figure II.10. Schéma illustrant les effets de cyclodextrines au niveau des membranes biologiques et la libération de l'invité. A : extraction du cholestérol et des phospholipides par les cyclodextrines ; B : libération de l'invité par B1 : dilution ; B2 : liaisons aux protéines plasmatiques ; B3 : absorption par les tissus.

Ce processus est différent de celui observé suite au traitement par un détergent. Le détergent s'incorpore lui-même dans la bicouche lipidique pour arracher ses constituants qui seront solubilisés sous forme de micelle sans aucune extraction sélective. Les CDs quant à elles arrachent et forment un réservoir des composants lipidiques au niveau de la couche aqueuse, par un phénomène de complexation réversible sans aucune incorporation préalable dans la membrane (Ohtani *et al*, 1989).

L'activité hémolytique des CDs est classée comme suit : β -CD $>$ α -CD $>$ γ -CD (Miyazawa *et al.*, 1995; Stella & He, 2008).

L' α -CD est la plus puissante dans l'extraction des phospholipides alors que la β -CD extrait plus spécifiquement le cholestérol membranaire et que la γ -CD est la moins sélective. En fait,

l'extraction préférentielle des phospholipides par l' α -CD est due à l'inclusion des chaînes hydrocarbonées des acides gras qui ont une taille complémentaire à la cavité de l' α -CD (Irie & Uekema, 1997). La chaîne latérale du cholestérol ayant une taille plus grande est incluse dans la cavité plus large de la β -CD. Les propriétés électrostatiques de la tête du phospholipide, sa charge et son moment dipolaire régissent l'action de l' α -CD (Debouzy *et al*, 1998). Par conséquent, l'affinité de l' α -CD varie d'un phospholipide à un autre et, si elle interagit fortement avec les phosphatidylinositols, les phosphatidylcholines ne sont pas affectés par sa présence. En fait les hydroxyles primaires de l' α -CD sont considérés comme un dipôle et sont attirés par la charge négative de l'inositol. Le phospholipide est alors arraché de la membrane et sa chaîne lipidique est incluse dans la cavité de l' α -CD. Concernant l'efficacité à extraire les phospholipides, les CDs sont classées comme suit : α -CD > β -CD > γ -CD (Ohtani *et al*, 1989). Cela permet uniquement de classer les CDs selon leur capacité à déstabiliser les membranes alors que la toxicité, *in vivo*, reste négligeable (Stella & He, 2008). En fait, les CDs perdent absolument leur capacité à interagir avec les constituants membranaires quand leur cavité est occupée (Irie & Uekema, 1997). De plus, la dérivation diminue cette capacité à solubiliser les constituants membranaires (Irie & Uekema, 1997).

II.12. Mécanismes de libération de l'invité du complexe d'inclusion

Différents mécanismes jouent un rôle important dans la libération de l'invité à partir de son complexe d'inclusion. La complexation ne fait intervenir que des interactions non covalentes entre l'hôte et l'invité. Par conséquent, l'invité est toujours en équilibre dynamique entre la forme libre et la forme encapsulée. Le mécanisme de libération de l'invité est régi par des paramètres cruciaux : la constante de formation (K_f), la géométrie et la stœchiométrie du complexe (Leclercq *et al*, 2010) et peut être déclenché par différents processus décrits ci-dessous :

II.12.1. La dilution

La dissociation du complexe par dilution semble être le mécanisme majeur de libération du PA (Figure II.10).

L'effet de la dilution dépend de la voie d'administration. Par exemple, cet effet est plus faible dans le cas d'une administration ophtalmique que parentérale (Stella *et al*, 1999).

II.12.2. Le déplacement de l'invité par compétition

Le déplacement par compétition de l'invité de la cavité de la CD est un facteur crucial pour sa libération *in vivo*. L'administration simultanée des parabènes à des formulations parentérales de complexes de CDs n'aboutit pas uniquement à la libération des PAs des CDs mais aussi à la perte de l'efficacité antimicrobienne des parabènes donc à leur complexation dans les CDs (Stella *et al*, 1999). De plus, il a été montré que l'addition d'alcool réduisait la K_f du complexe β -CD/2-naphtol et déplaçait le naphtol vers l'environnement aqueux (Van Stam *et al*, 1996). La co-administration d'un compétiteur est bénéfique surtout pour augmenter la libération et la biodisponibilité d'un PA fortement lié à la CD. C'est le cas de la phénylalanine avec le complexe CD/cinnarizine, *in vivo*, favorisant ainsi la libération de la cinnarizine (Tokumura *et al*, 1985).

II.12.3. La liaison aux protéines plasmatiques

In vivo, les protéines plasmatiques se lient au PA facilitant sa libération du complexe (Figure II.10). La liaison à ces protéines est surtout importante dans le cas des PAs fortement liés à la CD. Une étude, *in vivo*, a montré que l'HP- β -CD peut déplacer le naproxène et le flurbiprofène de leurs sites de liaison aux protéines plasmatiques (Frijlink *et al*, 1991). Donc le PA se partage entre la cavité de la CD et son site de liaison aux protéines plasmatiques. Cela montre l'importance de la liaison aux protéines plasmatiques pour la libération du PA de son complexe d'inclusion.

II.12.4. L'absorption du PA par les tissus

L'absorption tissulaire du PA est un mécanisme majeur pour la libération de son complexe d'inclusion (Figure II.10). L'importance de ce mécanisme se révèle surtout au niveau des sites biologiques où l'effet de dilution est minime et le risque d'irritation est élevé (ophtalmique, nasal, rectal, pulmonaire, sublinguale, dermique) ou dans le cas des PAs fortement liés à la CD (Jarvinen *et al*, 1994 ; Rajewski & stella, 1996). Le PA lipophile peut traverser les biomembranes par diffusion passive selon la première loi de Fick qui considère que le flux

membranaire est proportionnel au gradient de concentration (Kurkov & Loftsson, 2013). Le passage des CDs ou des complexes est considéré comme impossible du fait de leur hydrophilicité et de leur haut poids moléculaire (Leclercq *et al*, 2010). Donc, les CDs exercent le rôle de promoteur d'absorption en assurant le transport du PA de la phase aqueuse donneuse vers la barrière aqueuse à partir de laquelle il traverse la couche membranaire en fonction de son coefficient de partage. Plus précisément, les CDs augmentent la solubilité et la quantité du PA disponible à la surface de la barrière biologique. Cela est indispensable pour son absorption.

II.12.5. Le changement d'un paramètre physico-chimique

La libération de l'invité peut également être déclenchée par la variation de certains paramètres physicochimiques (température, changement du pH).

II.12.5.1. Le changement de la température

La complexation CD/invité a été décrite comme un processus exothermique. L'augmentation de la température déstabilise le complexe et déplace l'équilibre vers la libération de l'invité. De plus, la préparation se faisant souvent à température ambiante, la température corporelle, normalement plus élevée (37 °C), peut effectivement contribuer à la dissociation du complexe.

II.12.5.2. Le changement de pH et de la force ionique

Nous observons cet effet dans le cas d'invités ionisables ou de faibles électrolytes (Zia *et al*, 2001). La liaison entre l'invité et la CD est ainsi affectée par le pKa de l'invité et le pH de l'environnement. La forme ionisée d'une molécule présente généralement une faible affinité pour une molécule hôte de CD neutre en comparaison avec sa forme non ionisée.

II.13. Utilisation des cyclodextrines

Les CDs trouvent des applications dans de nombreux secteurs notamment dans le domaine pharmaceutique et cosmétique, agroalimentaire ainsi que le domaine du textile et de l'environnement.

Le Tableau II.7 présente des exemples de propriétés améliorées par l'utilisation de CDs dans différents domaines d'applications.

Tableau II.7. Exemples de propriétés améliorées par l'utilisation de cyclodextrines dans différents domaines d'applications.

Propriété	Produit concerné
<i>Applications pharmaceutiques</i>	
Amélioration de la biodisponibilité	Indométacine
Diminution des effets secondaires	Phénylbutazone
Augmentation de la solubilité	Prostaglandines, vitamines A, D, E, K
Augmentation de la stabilité	Vitamines A, E, acide acétylsalicylique
<i>Applications agroalimentaires et agrochimiques</i>	
Stabilité de produits volatils	Menthol, moutarde, confiseries
Résistance à l'oxydation	Framboise, miel
Resistance à l'hydrolyse	Aspartame
Masquage d'odeurs indésirables	Café, thé, limonène
Diminution du taux de cholestérol par son extraction	Beurre, lait, œuf
Prolongation des arômes	Bonbons, chewing-gum, épices
Amélioration de la stabilité	Insecticides
Amélioration de la solubilité	1,3-Dichloroprène
Diminution de la toxicité	Herbicides fongicides
<i>Applications cosmétiques</i>	
Diminution de l'effet irritant	Acide rétinolique
Masquage d'odeurs désagréables	Mercaptans
Amélioration du pouvoir moussant	Savons, mousses
Désodorisation des produits d'hygiène	Menthol, chlorophylle
Augmentation de la solubilité	Vitamine A, E
Stabilité des parfums	Essence de citron

II.13.1. Domaine pharmaceutique

Ce domaine est extrêmement concerné par les CDs. Plus que 90% des PAs en cours de développement souffrent d'une faible solubilité dans les phases aqueuses et en conséquence d'une faible biodisponibilité (Loftsson & Brewster, 2010). La biodisponibilité est la quantité de PA qui arrive à sa cible et la vitesse avec laquelle il y parvient. Elle est régie par la vitesse de dissolution et d'absorption intestinale et par la solubilité du PA. Concernant les complexes de CDs, le taux et la vitesse de dissolution du PA dépendent de ses caractéristiques

physicochimiques (hydrophobicité) et celles du complexe (stœchiométrie, stabilité) (Jambhekar & Breen, 2013). L'utilisation des CDs en pharmacie permet : l'élaboration de produits plus faciles à doser et à utiliser, l'augmentation de la stabilité des PAs, l'amélioration de leur dissolution et solubilité, l'augmentation de leur biodisponibilité et leur effet thérapeutique (Loftsson & Duchene, 2007 ; Thompson, 1997), la diminution des effets secondaires et la protection de l'estomac (Challa *et al*, 2005 ; Kanaka Durga Devi *et al*, 2010), la réduction de l'amertume du PA (Szejtli & Szenté, 2005), le relargage contrôlé du PA (Salustio *et al*, 2011), le transport du PA vers sa cible (le ciblage moléculaire) (Yin *et al*, 2013).

L'exemple le plus connu de l'utilisation des CDs dans la pharmacie est celui de la sugammadex (BRIDION®). C'est une γ -CD modifiée utilisée depuis 2008 comme antidote de certains curarisants. L'administration intraveineuse de la γ -CD neutralise les curarisants stéroïdiens (rocuronium, vécuronium) en formant un complexe inactif dans le plasma qui sera éliminé dans l'urine. Un autre exemple concerne les vaccins DAPTACEL® (Groupe Sanofi, Pasteur) contre la diphtérie, le tétanos et la coqueluche (avec la diméthyl- β -CD) (Crini, 2014).

L'utilisation des CDs dans la pharmacie a permis de spectaculaires progrès, à tel point que l'industrie pharmaceutique est devenue la première utilisatrice de CDs. De nombreux ouvrages, publications et revues décrivent les avantages de l'utilisation des CDs dans ce domaine (Duchene & Wouessidjewe, 1990; Duchene *et al*, 1986; 1999; 2005; Loftsson & Duchene, 2007). Des produits pharmaceutiques à base de CDs ont été mis sur le marché. Quelques exemples sont donnés dans le Tableau II.8 (Brewtser & Loftsson, 2007).

II.13.2. Domaine agroalimentaire

L'utilisation des CDs dans le domaine agroalimentaire a été largement discutée et détaillée dans la littérature (Alonso *et al*, 2009; Astray *et al*, 2009; Marques, 2010; Del Valle, 2004; Jiang *et al*, 2011 ; Martina *et al*, 2013; Szejtli, 2004; Szenté & Szejtli, 2004; Szejtli & Szenté, 2005). Les complexes d'inclusion des CDs permettent généralement: *a*) l'encapsulation et la libération contrôlée des arômes; *b*) la protection contre l'oxydation, la dégradation par la chaleur et la lumière des composés labiles; *c*) l'élimination des goûts et des odeurs désagréables; *d*) La prolongation de la durée gustative; *e*) la séquestration du cholestérol; *f*) la conservation des aliments; *g*) l'amélioration de temps d'action des herbicides, fongicides et phéromones. Une

application intéressante des CDs dans le domaine du tabac est la complexation de la nicotine et des goudrons ce qui permet d'augmenter l'efficacité des filtres.

Tableau II.8. Produits pharmaceutiques commercialisés à base de cyclodextrines (Brewtser & Loftsson, 2007).

Principe actif	Formulation	Nom commercial	Marché
<i>α-CD</i>			
Alprostadil	IV	Caverject, Dual	EU. (Pfizer)
PGE1	Parentérale	Prostavastin	EU. (Schwarz)/JPN. (Ono)
<i>β-CD</i>			
Cetirzine	Comprimé	Cetirizin	DEU. (Losan Pharma)
Dexamethasone	Pommade	Glymesason	JPN. (Fujinaga)
Nicotine	Comprimé	Nicorette	EU. (Pfizer)
Omeprazole	Comprimé	Omebeta	EU. (Betafarm)
Piroxicam	Comprimé	Brexin	EU. (Chiesi)
Acide tiaprofénique	Comprimé	Surgamyl	EU. (Roussel-Maestrelli)
<i>HP-β-CD</i>			
Itraconazol	Orale et I.V.	Sporanox	EU., É-U. (Janssen)
Cisapride	Suppositoire	Propulsid	EU. (Janssen)
Hydrocortisone	Solution	Dexocort	EU. (Actavis)
Indomethacin	Goutte oculaire	Indocid	EU. (Chauvin)
<i>RAMEB</i>			
17 β -Estradiol	Spray nasal	Aerodiol	EU. (Servier)
Chloramphenicol	Goutte oculaire	Clorocil	EU. (Oftalder)
<i>SBE-β-CD</i>			
Aripiprazole	I.M	Abilify	É-U. (Bristol-Myers Squibb/Otsuka Pharm.)
Maropitant	Parentérale	Cerenia	É-U. (Pfizer Animal Health)
Voriconazole	IV	Vfend	É-U., EU., JPN. (Pfizer)
Ziprasidone mesylate	I.M	Geodon, Zeldox	É-U., EU. (Pfizer)

DEU : Allemagne; EU : Europe; É-U : Etats-Unis; JPN : Japon.

II.13.3. Domaine cosmétique

Les CDs sont couramment utilisées dans les produits cosmétiques. L'application dans le monde cosmétique se trouve à mi-chemin entre les domaines pharmaceutique et agroalimentaire. Ainsi, les CDs sont utilisées pour: *a)* la protection des arômes, les colorants et les vitamines durant le stockage; *b)* l'augmentation de la solubilité des produits hydrophobes; *c)* la conversion des produits liquides en poudre; *d)* la protection contre la dégradation, l'oxydation, l'hydrolyse et l'évaporation; *e)* la diminution des irritations de la peau; *f)* l'augmentation de l'absorption dermique; *g)* la diminution des interactions entre les constituants d'un même produit; *h)* la stabilisation des émulsions et des suspensions; *i)* l'élimination ou la réduction des odeurs désagréables (Buschmann & Schollmeyer, 2002; Hougeir & Kircik, 2012; Marques, 2010).

II.13.4. Domaine du textile

Dans ce domaine les CDs sont surtout impliquées au niveau du finissage des textiles (Ammayappan & Jeyakodi Moses, 2009; Liu *et al*, 2012). Elles permettent de supprimer ou masquer les odeurs indésirables (Martel *et al*, 2002) ou bien de renforcer l'absorption des colorants par le tissu et donc réduire leur perte durant le rinçage. De plus, les CDs permettent de récupérer une partie des colorants présents dans les eaux de lavage des usines (Hedges, 1998).

II.13.5. Domaine de l'environnement

L'utilisation des CDs dans le domaine environnemental a été explorée depuis les années 1980. Les CDs sont employées surtout pour extraire et réduire la volatilité des polluants organiques atmosphériques ainsi que ceux qui se trouvent dans les sols ou les eaux (Blach *et al*, 2008; Fakayode *et al*, 2007; Landy *et al*, 2012). Les CDs servent notamment, au piégeage des hydrocarbures aromatique polycyclique (HAPs) (Sui *et al*, 2013; Sun *et al*, 2013), des pesticides (Churchill *et al*, 2006), de la nitrosamine (Wang *et al*, 2004) et du naphtalène (Dou *et al*, 2011).

II.14. Complexation des huiles essentielles par les cyclodextrines

Les exemples rapportés dans la littérature pour améliorer les propriétés des HEs et de leurs constituants suite à leur encapsulation par les CDs sont nombreux (Tableau II.9). Nous présenterons ici quelques effets de la complexation des HEs par des CDs.

Tableau II.9. Quelques exemples d'applications des complexes CD/composants d'HEs

Composant d'HE	CD	Caractéristiques améliorées
Acétaldéhyde ^a	α -, β -, γ -CD	Antifongique
Bornéol ^b	β -CD	Solubilité, stabilité
Camphor ^c	α -, β -, γ -CD	Solubilité
Carvacrol ^d	α -, β -, HP- β -CD	Solubilité, antibactérienne, antifongique
Carvone ^{e,f}	β -, G2-, GUG- β -CD	Stabilité, solubilité
<i>trans</i> -Cinnamaldéhyde ^g	β -CD	Solubilité, antibactérienne
Citral ^f	β -, G2-, GUG- β -CD	Solubilité, stabilité
Citronnellal ^f	β -, G2-, GUG- β -CD	Solubilité, stabilité
<i>p</i> -Cymène ^h	β -CD	Analgésique, anti-inflammatoire
Eugénol ^{d,g,i,j,k,l,m}	α -, β -, HP- β -CD	Stabilité, solubilité, antibactérienne, antifongique
Géraniol ^{f,n}	β -, G2-, GUG- β -CD	Solubilité, stabilité
Limonène ^{e,f}	β -, G2-, GUG- β -CD	Stabilité, solubilité
Linalol ^{d,o,p}	α -, β -, HP- β -CD	Solubilité, stabilité, analgésique, anti-inflammatoire, antibactérienne, antifongique
Menthol ^f	β -, G2-, GUG- β -CD	Solubilité, stabilité
Menthone ^f	β -, G2-, GUG- β -CD	Solubilité, stabilité
Myrcène ^f	β -, G2-, GUG- β -CD	Solubilité, stabilité
Nérol ^f	β -, G2-, GUG- β -CD	Solubilité, stabilité
2-Pentanoylefuran ^d	α -, β -, HP- β -CD	Solubilité, antibactérienne, antifongique
Pérrillaldehyde ^f	β -, G2-, GUG- β -CD	Solubilité, stabilité
Pulégone ^q	β -, γ -CD	Stabilité
Terpinéol ^{f,r,s}	β -, HP- β -, G2-, GUG- β -CD	Stabilité, solubilité
Thymol ^{n,t,u}	β -CD	Solubilité, stabilité, antifongique, profil pharmacocinétique
Vanilline ^v	α -, β -, γ -CD	Stabilité

^aAlmenar *et al*, 2007; ^bSu *et al*, 2012; ^cYu *et al*, 2003; ^dLiang *et al*, 2012; ^ePartanen *et al*, 2002; ^fAjisaka *et al*, 2000; ^gHill *et al*, 2013; ^hDe Souza Siqueira Quintans *et al*, 2013; ⁱSeo *et al*, 2010; ^jChoi *et al*, 2009; ^kGarg *et al*, 2010; ^lHernandez-Sanchez *et al*, 2012; ^mWang *et al*, 2011a; ⁿMourtzinos *et al*, 2008; ^oNumanoglu *et al*, 2007; ^pQuintans-Junior *et al*, 2013; ^qMoon *et al*, 2008; ^rDos Santos *et al*, 2012; ^sMazzobre *et al*, 2011; ^tDel Toro Sanchez *et al*, 2010; ^uNieddu *et al*, 2014; ^vKayaci & Uyar, 2011.

II.14.1. Augmentation de la solubilité

Les HEs et leurs composants sont utilisés dans diverses industries. Ils souffrent cependant d'une faible solubilité aqueuse. Les complexes d'inclusion de CDs permettent d'augmenter leur solubilité et leur vitesse de dissolution et donc leur biodisponibilité. De plus, la complexation permet de diminuer la volatilité ainsi que la tendance à l'agrégation de ces molécules lipophiles (Pinho *et al*, 2014).

II.14.2. Augmentation de la stabilité

Les composants des HEs sont connus pour être très sensibles à la lumière, l'air, la température et au pH (Turek & Sintzing, 2013). Les CDs permettent d'augmenter la stabilité de l'invité piégé vis-à-vis de l'hydrolyse, l'oxydation, les réarrangements stériques, l'isomérisation, la racémisation, la polymérisation et même la décomposition enzymatique (Pinho *et al*, 2014). L'encapsulation ralentit voire supprime la réactivité de l'invité (Marques, 2010). Les CDs sont capables, par exemple, d'empêcher les réactions de brunissement enzymatique du jus de poire (Lopez-Nicolas *et al*, 2007). Szejtli et Szenté (1979) ont montré également que l'encapsulation du citral par la β -CD inhibait la formation des photocitrales et des autres monoterpènes cycliques suite à l'exposition aux UV.

II.14.3. Réduction de la volatilité

La complexation par les CDs en solution ou à l'état solide permet de réduire leur volatilité, limitant ainsi les pertes par évaporation. Il a été démontré que l'encapsulation diminuait la volatilité du linalol et de l'acétate de benzyle (Numanoglu *et al*, 2007). Une autre étude a montré que les CDs et leurs polymères pouvaient retenir les arômes en solution comme en phase gazeuse (Ciobanu *et al*, 2012). Les CDs ont montré également une capacité de réduire la pression de vapeur de parfums synthétiques (Qu *et al*, 2003). Les CDs possèdent ainsi un potentiel efficace de protection des HEs et des arômes. Cet effet est largement recherché dans les domaines agroalimentaires et cosmétiques.

II.14.4. Diminution des effets indésirables

Le principal effet secondaire des HEs est l'irritation des muqueuses et de la peau. L'encapsulation réduit ces effets secondaires pour différentes raisons. L'augmentation de la biodisponibilité comme nous avons déjà évoqué précédemment permet de réduire les doses et ainsi que les effets indésirables. De plus, la dissolution rapide qu'offrent les complexes de CD évite le contact direct de l'invité avec la muqueuse gastrique et l'agrégation des molécules lipophiles ce qui diminue par conséquent l'irritation de la muqueuse gastrique (Warrington, 1993). De plus, certaines molécules peuvent avoir une odeur ou un goût désagréable. La β -CD permet de masquer, par exemple, le goût amer du jus de pamplemousse et de mandarine (Szente & Szejtli, 2004). Une étude a montré que l'administration sous forme de complexe de β -CD pouvait réduire le nombre d'administration journalière du thymol, présentant un goût amer et irritant utilisé pour le traitement ou la prévention des infections intestinales bactériennes (Nieddu *et al*, 2014).

II.14.5. Transformation d'un liquide en poudre

Compte tenu de leur sensibilité à la présence d'eau, la contamination, l'oxydation, la photodégradation et à l'état visqueux de certains (Turek & Stintzing, 2012), les HEs et leurs constituants présentent de problèmes de manipulation et de stabilité. Après complexation et séchage, la poudre obtenue est facile à manier et présente l'avantage de conserver les HEs sous forme solide. Cela répond à la tendance actuelle qui se déplace vers les technologies des formes sèches. La perte de l'eugénol dans un complexe solide de β -CD ne dépasse pas les 10% (en masse) après 4 semaines de stockage à 25°C et sous une humidité de 75% (Wang *et al*, 2011a).

II.14.6. L'amélioration des activités biologiques

Les composants d'HEs présentent une importante activité antimicrobienne, antioxydante, anti-inflammatoire, anticancéreuse, etc. (Saad *et al*, 2013). L'encapsulation moléculaire avec les CDs pourraient répondre à un objectif fondamental de l'amélioration de l'efficacité thérapeutique des ces molécules tout en les protégeant et diminuant leurs effets indésirables. Les effets bénéfiques des CDs sur l'activité biologique de l'invité sont rapportés, par exemple, par Mercader-Ros *et al* (2010) qui ont montré une protection des flavonols, kaempferol, quercétin et myricétin, vis-à-vis de l'attaque par les radicaux libres. De même, Daruhazi *et al* (2013) ont

montré l'amélioration de la capacité des isoflavonoïdes, genistein et daidzein, à traverser les membranes biologiques.

II.14.7. Libération contrôlée

Les HEs et les arômes sont largement utilisés en aromathérapie. Dans ce cadre, il est important d'avoir une libération prolongée. Martel *et al* (2002) ont utilisé des textiles modifiés par des CDs pour la libération prolongée des arômes. Ils ont montré que l'odeur de ces arômes pouvait encore être perçue après un an pour les textiles modifiés par les CDs, alors qu'elle ne persistait pas plus de quelques semaines pour les textiles non modifiés. Divers CDs et polymères de CD ont ainsi été utilisés pour permettre la libération prolongée d'arômes (Ciobanu *et al*, 2012, 2013a ; Yuan *et al*, 2014). Cette propriété peut être intéressante pour la réalisation de désodorisants ou pour l'aromathérapie. La libération des composés peut être modulée en fonction de la température ou de l'humidité (Yamamoto *et al*, 2012). Les propriétés antibactériennes de certains arômes ou HEs sont également mises à profit dans des emballages alimentaires, leur libération prolongée permettant ainsi une plus longue conservation des aliments (Del Toro Sanchez *et al*, 2010).

Le Tableau II.10 présente quelques exemples de produits commercialisés contenant des composants d'HEs encapsulés par les CDs (Szente & Sjetli, 2004).

Tableau II.10. Exemples de produits commercialisés contenant des composants d'HEs encapsulés par les cyclodextrines (Szente & Sjetli, 2004).

Produit	Nature du produit	Effet de la complexation	Marché
<i>Aliments</i>			
FlavorAktiv Standard Kit	Bière	Préservation des arômes de la bière	GBR
Flavono	Mastique	Stabilisation des arômes	JPN.
Choco Bar	Chocolat	Emulsification	JPN.
Poder Tea	Thé	Stabilisation de la couleur	JPN.
Gymet	Jus	Masquage du goût	JPN.
Stick Lemon	Thé	Préservation du goût	JPN.
Cryoma-line	Sucre aromatisé	Stabilisation des arômes	HUN.
<i>Médicaments</i>			
Tegra	Anti-athérosclérose	Masquage de l'odeur d'ail, augmentation de la stabilité	DEU. (Hermes/SanaPharm)
Xund	Anti-athérosclérose	Masquage de l'odeur d'ail, augmentation de la stabilité	DEU. (Biopharm)

Garlessence	Anti-athérosclérose	Masquage de l'odeur d'ail, augmentation de la stabilité	É-U. (CTD)
Allidex	Anti-athérosclérose	Masquage de l'odeur d'ail, augmentation de la stabilité	HUN. (Pharmafontana)

DEU : Allemagne; É-U : Etats-Unis; GBR : Grande Bretagne; HUN : Hongrie; JPN : Japon.

II.15. Conclusion

Au travers de cette partie bibliographique des connaissances sur les HEs, leurs composants et les CDs, il semble que le potentiel d'utilisation des CDs avec les phénylpropanoïdes (PPs) est loin d'être totalement exploité. L'affinité remarquable des CDs pour les molécules hydrophobes peut être mise à profit pour l'encapsulation des PPs. La formation de complexes d'inclusion peut être conditionnée par les caractéristiques physicochimiques de ces molécules ainsi que par l'affinité relative des différentes CDs en question. L'encapsulation peut également avoir différents impacts sur les caractéristiques physicochimiques et les activités biologiques des PPs.

Nous développerons ainsi dans les chapitres suivants la formation de complexes d'inclusion entre les CDs et quelques PPs. Nous verrons ainsi que l'encapsulation en CDs permet une meilleure solubilisation des PPs dans l'eau, une augmentation de leur stabilité et une libération contrôlée. Cela permet, par conséquent, de conserver et prolonger les propriétés biologiques qu'ils procurent. Les facteurs affectant la formation des complexes d'inclusion ainsi que les activités biologiques seront également discutés.

Stratégie de travail

Le but de ce travail était d'encapsuler dans les cyclodextrines (CDs) certains métabolites secondaires chez les plantes (Diagramme 1) et évaluer les effets de l'encapsulation sur leurs propriétés physicochimiques et biologiques.

Les sept composés étudiés dans ce travail (*trans*-anéthol, estragole, eugénol, isoeugénol, acide caféique, acide *p*-coumarique et acide férulique) font partie d'une grande famille de métabolites secondaires chez les plantes, la famille des phénylpropanoïdes (PPs).

Ces PPs sont connus pour leurs activités antimicrobienne et antioxydante. Or, leur application est limitée à cause de leur volatilité et leur faible solubilité dans l'eau. L'encapsulation dans les CDs permet d'augmenter la solubilité des PPs ainsi que de générer des systèmes de protection, de stockage et de libération prolongée et contrôlée de ces molécules.

Le choix de ces PPs a été guidé par leur homologie structurale, leurs propriétés biologiques intéressantes et le fait qu'ils sont naturellement distribués dans une grande variété de plantes consommées dans notre vie courante.

Le *trans*-anéthol, l'estragole, l'eugénol et l'isoeugénol sont des composés aromatiques de la famille des phénylpropènes, une sous classe des PPs. Les acides caféique, *p*-coumarique et férulique appartiennent à la sous classe des acides hydroxycinnamiques.

L'ensemble de ces sept PPs possède une structure de base commune constituée d'un noyau aromatique (phényle, C6) et d'une chaîne latérale à trois carbones (C3).

Les *trans*-anéthol/estragole et eugénol/isoeugénol sont deux couples d'isomères. La structure de l'eugénol et l'isoeugénol s'agit d'un phénol 2,4-disubstitués le phénol est substitué en *ortho* par un méthoxy et en position *para* par une chaîne propényle. Le *trans*-anéthol et l'estragole renferment dans leur structure un noyau aromatique *para*-substitués par une chaîne propényle et un groupe méthoxy. La seule différence dans la structure des deux composés de chaque couple d'isomères est la position de la double liaison du groupe propényle qui est en bout de chaîne (groupe vinyle) pour l'estragole et l'eugénol et au milieu du groupe propényle pour le *trans*-anéthol et l'isoeugénol. La double liaison de la chaîne propényle du *trans*-anéthol et de l'isoeugénol est donc en conjugaison avec le cycle aromatique.

Les acides caféique, *p*-coumarique et férulique renferment dans leur structure de base un groupe acrylique ($-\text{CH}=\text{CHCOOH}$) remplaçant la chaîne propényle chez les phénylpropènes.

L'acide *p*-coumarique est un monophénol possédant un groupe hydroxyle en position *para* du groupement acrylique.

L'acide caféique se différencie, simplement, de l'acide *p*-coumarique par la présence d'un second groupe hydroxyle en position *mé*ta du groupement acrylique qui lui donne des propriétés propres aux polyphénols.

L'acide férulique possède une structure très proche de l'acide caféique. La seule différence étant un groupe méthoxy (en *mé*ta du groupe acrylique) à la place du groupe hydroxyle.

La double liaison du groupe acrylique de ces trois acides est conjuguée au noyau aromatique.

Nous avons choisi cinq CDs (α -CD, β -CD, HP- β -CD, RAMEB et CRYSMEB) pour l'encapsulation de ces PPs. Avant de procéder à l'évaluation des propriétés biologiques des PPs et de leurs complexes d'inclusion, il était nécessaire de préparer et caractériser les complexes d'inclusion en solution et à l'état solide.

L'affinité entre les CDs et les PPs a été étudiée en solution par headspace statique couplé à la chromatographie en phase gazeuse (HS-CG) et par spectroscopie UV-Visible. Les constantes de formation (K_f), la stoechiométrie des complexes ainsi que l'effet de l'encapsulation sur la solubilité des PPs ont ainsi été déterminées. De plus la caractérisation structurale des complexes d'inclusion a été menée par spectroscopie RMN.

Les complexes d'inclusion CD/PP ont été également préparés à l'état solide et séchés par la technique de lyophilisation. Les efficacités d'encapsulation (EE%) et la teneur des PPs dans les complexes solides ont été déterminées par UV-Visible et par «extraction multiple» de l'espace de tête (Multiple Headspace Extraction, MHE). La FTIR et la DSC ont été aussi employées pour prouver l'inclusion des PPs à l'intérieur de la cavité des CDs. Une étude théorique de modélisation moléculaire a été également menée pour simuler la géométrie et la structure des complexes d'inclusion et conforter les résultats expérimentaux.

Dans ce travail, la stabilité des PPs libres et encapsulés en solution ou en forme de complexes d'inclusion solides a été suivie au cours du temps dans des conditions différentes (irradiations, chauffage, humidité).

Enfin, après avoir obtenu et caractérisé les complexes d'inclusion, l'efficacité des CDs à jouer le rôle d'un vecteur pour les principes actifs a été évaluée en déterminant, *in vitro*, les activités antioxydante, antifongique et antibactérienne des PP et de leurs complexes d'inclusion.

Les digrammes ci-dessous (Digrammes 1 et 2) résument la méthodologie suivie dans notre étude, les méthodes et techniques utilisées et les paramètres qui ont été recherchés.

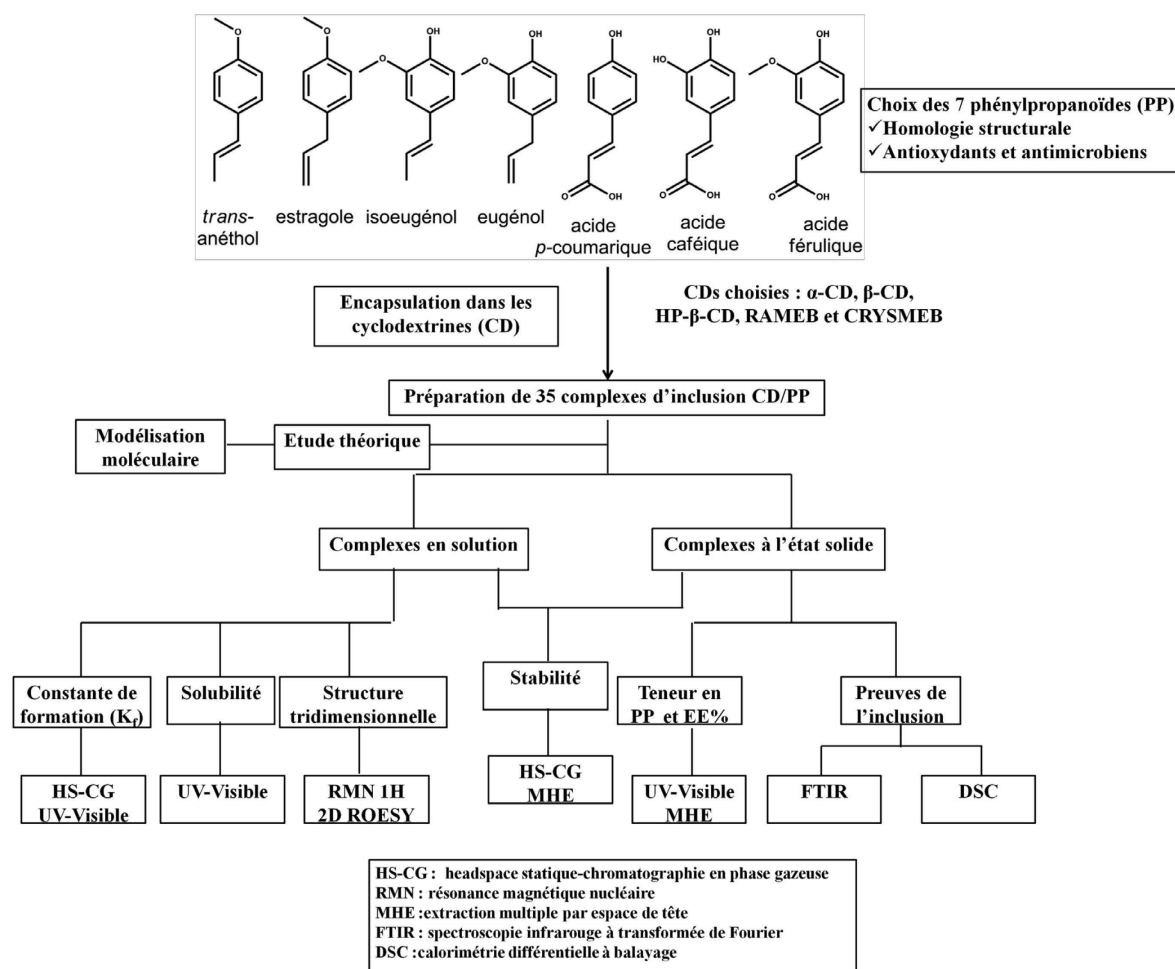


Diagramme 1. Méthodologie suivie dans notre étude pour la préparation et la caractérisation physicochimique des complexes d'inclusion en solution et à l'état solide.

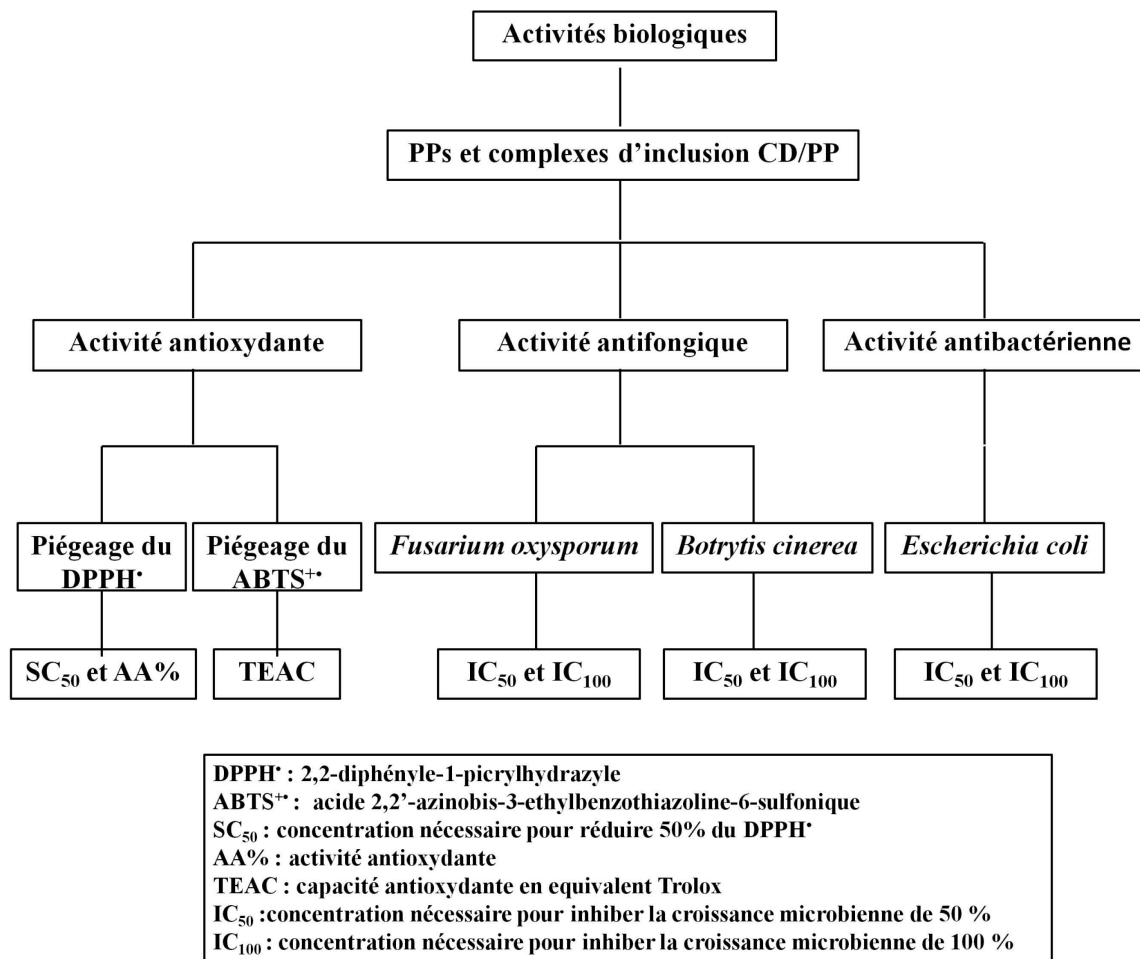


Diagramme 2. Méthodologie suivie dans notre étude pour la détermination des activités biologiques des phénylpropanoïdes et de leurs complexes d'inclusion.

Partie 2. Etude du phénomène d'inclusion

Chapitre III. Caractérisation des complexes d'inclusion en solution

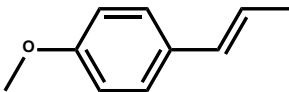
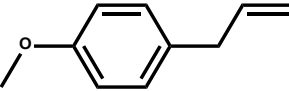
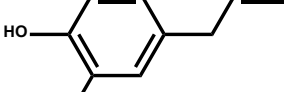
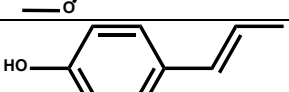
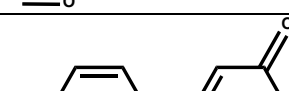

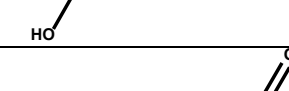
Le développement de formulations pour le domaine agroalimentaire ou pharmaceutique à base de complexes d'inclusion de CDs avec les PPs nécessite une première phase de recherche consistant à évaluer et caractériser les interactions entre ces espèces. Le but de cette première partie expérimentale consiste à mettre en évidence l'existence de complexes d'inclusion entre les différentes CDs et PPs en solution aqueuse. Les molécules hôtes testées sont des CDs natives (α -CD et β -CD) ou modifiées (HP- β -CD, CRYSMEB, RAMEB). Deux types de PPs ont été choisis appartenant d'une part à la famille des phénylpropènes (*trans*-anéthol, estragole, eugénol et isoeugénol) et, d'autre part, à celle des acides hydroxycinnamiques (acide caféique, acide *p*-coumarique et acide férulique) (Tableau III.1).

Les constantes de formation ou de stabilité (K_f) des complexes d'inclusion ont été déterminées expérimentalement par la technique de l'espace de tête en mode statique ou « *static headspace* » couplée à la chromatographie en phase gazeuse (HS-CG) et par spectroscopie UV-Visible en appliquant une méthode par compétition (dite méthode de déplacement spectral). Ces techniques fournissent l'évidence directe de la formation de complexe d'inclusion.

Le but de notre étude étant de déboucher sur des applications agroalimentaires ou pharmaceutiques de ces complexes d'inclusion, il était nécessaire d'évaluer la stabilité des complexes dans un contexte de force ionique semblable aux conditions corporelles. Pour ce faire les K_f ont été également calculées dans le tampon phosphate salin (PBS, pH=7,4).

L'effet des CDs sur la solubilité des PPs a été suivi par des études de phase de solubilité. Les K_f ont également été calculées à partir des profils de phase de solubilité obtenus. Les résultats ont été exploités en termes de gain de solubilité des PPs encapsulés comparativement à leur solubilité aqueuse intrinsèque. L'efficacité de complexation (CE), le rapport molaire optimal nécessaire pour une encapsulation optimale des PPs (PP:CD) et l'augmentation du volume du dosage ou de la formulation ont également été déterminés.

Tableau III.1. Structures et caractéristiques physicochimiques des PPs étudiés.

Nom commun	Nom IUPAC	Structure	LogP ^a
<i>trans</i> -Anéthol	<i>trans</i> -1-méthoxy-4-(prop-1-enyl)benzène		3,096
Estragole	1-allyl-4-méthoxybenzène		2,818
Eugénol	2-méthoxy-4-(2-propényl)-phénol		2,100
Isoeugénol	2-méthoxy-4-(prop-1-én-1-yl)phénol		2,379
Acide <i>p</i> -coumarique	acide 3-(4-hydroxyphényl)-prop-2-énoïque		1,43
Acide caféique	acide (E) 3-(3,4-dihydroxyphényl)prop-2-énoïque		0,941
Acide férulique	acide 3-(4-hydroxy-3-méthoxyphényl)prop-2-énoïque		1,249

^aLog P. <http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>.

De plus, la structure tridimensionnelle des complexes CD/PP a été élucidée par spectroscopie RMN ¹H et 2D ROESY.

Ces travaux de caractérisation constituent une étude de faisabilité préalable et indispensable pour l'optimisation du choix des systèmes CD/PP pour le développement des formulations envisagées.

III.1. Détermination de la constante de Henry (Hc)

L'application de la technique de l'espace de tête nécessite une étape primordiale de la détermination du coefficient de partage du composé étudié à l'équilibre entre l'état vapeur et l'état liquide, i.e. sa constante de Henry (Hc) (Bakierowska & Trzeszczynski, 2004).

Deux lois régissent cet équilibre ; *a) la loi de Raoult* : la tension de vapeur à l'équilibre d'un composé volatil au-dessus de sa solution est directement proportionnelle à sa fraction molaire en solution ; *b) la loi de Henry* : la solubilité d'un composé volatil en solution est directement proportionnelle à sa pression partielle en phase gazeuse qui est en contact avec le liquide.

Donc, la quantité de chaque composé volatil présente dans la phase gazeuse ou l'espace de tête est proportionnelle à sa concentration en solution.

L'équation suivante illustre l'équilibre de partage d'un composé entre une phase gazeuse et une solution aqueuse non saturée:

$$H_c = \frac{P_i}{X_i} = \frac{C_g}{C_l} \quad \text{III.1}$$

Avec Hc : la constante de Henry ; P_i : la pression partielle du composé en phase gazeuse ; X_i : la fraction molaire du composé en solution ; C_g : la concentration du composé en phase gazeuse exprimée en mol.L⁻¹ ; et C_l : la concentration du composé en phase aqueuse exprimée en mol.L⁻¹.

III.1.1. Méthodologie

Dans le cadre de notre étude, la détermination expérimentale de Hc a été menée selon la méthode PRV « *Phase Ratio Variation* ». Cette méthode consiste à utiliser différents rapports liquide/gaz en ajoutant une même quantité de composé. Les vials préparés sont ensuite équilibrés dans une enceinte thermostatée. Le temps nécessaire à l'établissement de l'équilibre entre les deux phases et la température d'équilibre sont de première importance vu la dépendance de Hc des facteurs thermodynamiques définis par l'équation de Van't Hoff (Staudinger & Roberts, 2001). Dans notre travail, nous avons utilisé quatre rapports liquide/gaz pour la détermination de Hc en plaçant 2, 5, 7 et 10 mL d'eau dans des vials de 22 mL. Comme les composés volatils étudiés sont faiblement solubles dans les phases aqueuses, des solutions à 10000 ppm dans de l'éthanol absolu ont été préparées. Ces solutions seront utilisées dans la suite du travail. A partir

de ces dernières des quantités égales de composé sont ajoutées dans les vials. La teneur finale en éthanol est inférieure à 0,1 %. Gossett (1987) a montré que l'addition de méthanol en faibles proportions (0,1 ; 0,5 ; 1,0 ; 2,0 %) n'influe pas sur la valeur de Hc du tétrachoroéthylène, alors qu'à des teneurs supérieures à 5 % l'addition du méthanol induisait une diminution de Hc. Le temps et la température d'équilibre ont été fixés à 30 min et 25 °C, respectivement. Ensuite, l'espace de tête des vials a été analysé par chromatographie en phase gazeuse.

D'après le principe de conservation des masses, la masse totale du composé présente dans chaque vial est la somme des masses présentes en phase gazeuse et en solution après équilibre :

$$C_{l_0} V_l = C_l V_l + C_g V_g \quad \text{III.2}$$

Avec C_{l_0} : concentration du composé dans la solution aqueuse initiale exprimée en mol.L^{-1} ; V_l : volume de la solution aqueuse dans le vial (mL) ; C_l : concentration du composé dans la solution aqueuse à l'équilibre exprimée en mol.L^{-1} ; C_g : concentration du composé dans la phase gazeuse à l'équilibre exprimée en mol.L^{-1} ; V_g : volume de la phase gazeuse dans le vial (mL).

Comme les concentrations dans la phase gazeuse et dans la phase aqueuse sont reliées par l'équation de Henry, l'équation à l'équilibre peut être écrite de la façon suivante :

$$C_{l_0} V_l = C_g \frac{V_l}{H_c} + C_g V_g \quad \text{III.3}$$

Or la concentration de la phase gazeuse est proportionnelle à l'aire du pic chromatographique (A)

$$A = \alpha C_g \quad \text{III.4}$$

Donc l'équation sera sous la forme suivante:

$$C_{l_0} V_l = \frac{A \cdot V_l}{\alpha \cdot H_c} + \frac{A}{\alpha} V_g \quad \text{III.5}$$

La relation permettant le calcul de Hc sera simplifiée selon la forme suivante:

$$\frac{C_{l_0}}{A} = \frac{1}{\alpha} \left(\frac{1}{H_c} + \frac{V_g}{V_l} \right) \quad \text{III.6}$$

Avec A: aire du pic chromatographique ; α : constante de l'« headspace ».

Le tracé de C_{10}/A en fonction de V_g/V_l donne par régression linéaire la pente $1/\alpha$ et l'ordonnée à l'origine $1/\alpha H_c$. La valeur de H_c est obtenue par le rapport pente/ordonnée à l'origine.

Les conditions expérimentales utilisées lors de la détermination de H_c et durant toutes les analyses où la chromatographie gazeuse est employée sont présentées dans le Tableau III.2.

Tableau III.2. Conditions expérimentales utilisées en chromatographie phase gazeuse.

PP	Température de la colonne	Temps d'analyse
<i>trans</i> -Anéthol	160 °C	6 min
Estragole	160 °C	5 min

III.1.2. Résultats et discussion

Avant d'étudier l'effet des CDs sur la rétention des PP les plus volatils (*trans*-anéthol et estragole) et la caractérisation de leurs complexes d'inclusion, nous avons calculé leur H_c sans dimension. Nous avons appliqué la méthode PRV dans l'eau ou dans le PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,76 mM KH₂PO₄) à 25 °C.

Nous remarquons que la volatilité des deux composés diminue en augmentant le volume de la phase liquide d'eau ou de PBS (Figure III.1).

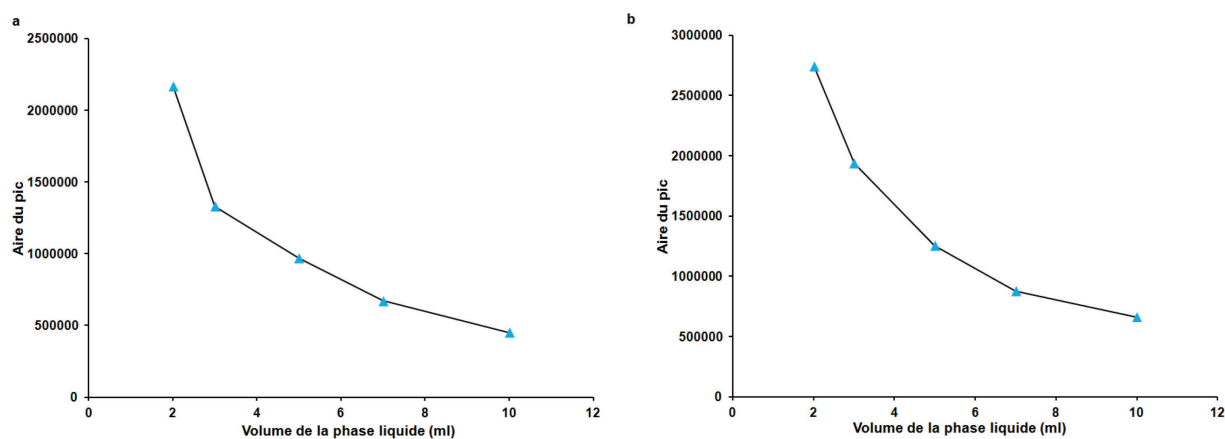


Figure III.1. Réduction de la volatilité du a) *trans*-anéthol et de b) l'estrageole avec l'augmentation du volume de la phase liquide.

Les H_c calculées sont présentées dans le Tableau III.3. Aucune valeur expérimentale n'est trouvée dans la littérature. Les résultats obtenus coïncident avec les valeurs théoriques qui sont

égales à 0,0114 et 0,0206 pour le *trans*-anéthol et l'estragole, respectivement (<http://www.chemspider.com>).

Aucune différence significative n'est observée entre les H_c calculées dans l'eau et dans le PBS. Cela montre que la force ionique du PBS n'affecte pas la volatilité de ces composés. Cela peut être dû à la faible concentration en sel présente dans ce tampon.

Tableau III.3. Constantes de Henry (H_c) dans l'eau et dans le PBS à 25°C.

PP	Eau	PBS
<i>trans</i> -Anéthol	0,0116	0,0131
Estragole	0,0276	0,0222

III.2. Détermination de la capacité de rétention des CDs (r%)

III.2.1. Méthodologie

La capacité de rétention des produits volatils en solution par les CDs et leurs dérivés a été étudiée par HS-CG. Cent mg de CDs sont placés dans un vial en présence de 10 mL d'eau ou de PBS. Dix ppm du produit volatil sont ensuite ajoutés et les vials sont scellés et laissés à l'équilibre pendant 24 h à 25 °C. La rétention par les CDs (r%) est calculée par comparaison avec un vial ne contenant pas de CD. En fait, en ajoutant des CDs dans une solution aqueuse, un nouvel équilibre mettant en jeu trois états du soluté s'établit dans le vial : *a*) le soluté dans la phase gazeuse, *b*) le soluté en solution et *c*) le soluté dans sa forme complexée (Figure III.2).

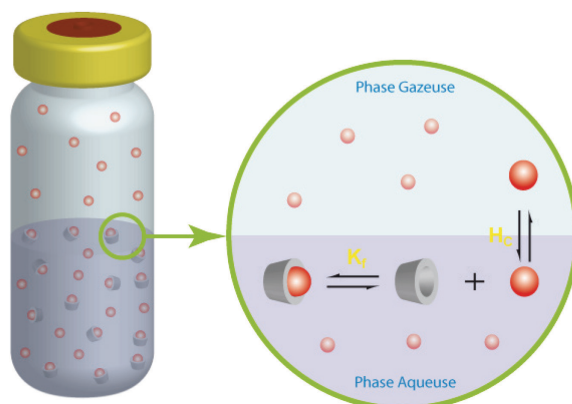


Figure III.2. Schéma illustrant l'équilibre entre les formes libre et complexée de l'invité.

Une diminution de l'aire du pic chromatographique du soluté est observée en fonction de l'augmentation de la concentration de CD. Cette diminution est proportionnelle à la capacité de

rétenion ou de complexation de la CD et est due à la perte de volatilité de l'invité donc à une meilleure dissolution dans la phase aqueuse.

La capacité de rétenion des CDs ($r\%$) est calculée par la relation suivante :

$$r(\%) = \left(1 - \frac{A_{CD}}{A_0} \right) \times 100 \quad \text{III.7}$$

Avec A_0 et A_{CD} : les aires des pics chromatographiques des invités en absence et en présence de CD, respectivement.

III.2.2. Résultats et discussion

Pour chaque PP, nous observons une diminution de l'aire du pic chromatographique en présence de CD. Cela reflète la capacité de rétenion et de piégeage des CDs. En fait, cette perte de volatilité est due à une amélioration de la solubilité apparente des composés dans la phase aqueuse. Les résultats obtenus sont présentés dans la Figure III.3.

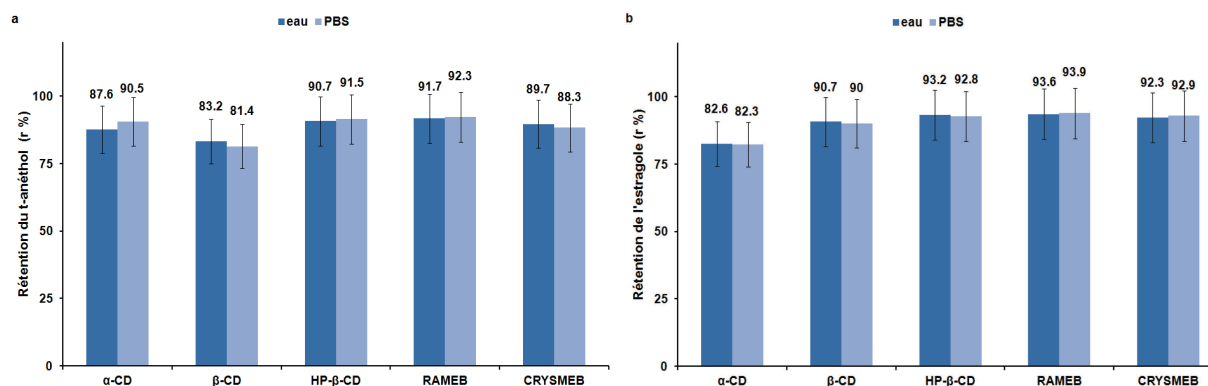


Figure III.3. Capacité de rétenion des CDs ($r\%$) pour a) le *trans*-anéthol et b) l'estragole.

Nous n'observons pas de différence considérable entre les valeurs obtenues dans l'eau et dans le PBS, ce qui nous permet de déduire que la faible concentration en NaCl présente dans le PBS (137 mM) n'a pas d'impact sur la capacité de rétenion ou de piégeage des CDs. Donc, des concentrations de NaCl nettement *plus élevées* que celle présente dans le PBS sont nécessaires pour induire un effet de « *salting out* ». De plus, cet effet est d'autant plus remarquable que la polarité des composés est plus grande (Fourmentin *et al*, 2013; Kolb & Ettre, 2006).

A la vue de la Figure III.3, nous pouvons déduire que les dérivés de la β -CD sont plus efficaces que les CDs natives. La β -CD montre la plus faible capacité de rétention pour le *trans*-anéthol et l' α -CD pour l'estragole.

III.3. Détermination des constantes de formation (K_f)

Les K_f des complexes d'inclusion CD/PP ont été déterminées en solution par HS-GC et par spectroscopie UV-Visible.

III.3.1. Détermination des constantes de formation (K_f) par HS-GC

III.3.1.1. Méthodologie

La technique « *headspace* » permet également de calculer les K_f des complexes CD/invité. Les méthodes utilisées pour la détermination des K_f par HS-GC sont la méthode classique et la méthode rapide.

III.3.1.1.1. Méthode classique

Pour la détermination de K_f , la concentration d'un partenaire du complexe est maintenue constante alors que celle de l'autre varie. Dans notre travail, la concentration en invité volatil est maintenue constante tandis que la concentration en CD a été variée. L'évolution de l'aire du pic chromatographique du composé volatil est suivie par chromatographie gazeuse en injection par headspace statique. En présence de CD, un nouvel équilibre s'établit dans le vial et seul l'invité non complexé est volatil. Le complexe formé est soluble dans la phase aqueuse. La valeur de K_f est déterminée en se basant sur la relation développée par Wu *et al* (1999) comme suit :

$$[CD] = [CD]_T (A - A_{CD}) / K' \quad \text{III.8}$$

Avec A_0 et A_{CD} : les aires du pic chromatographique de l'invité en absence et en présence de CD, respectivement ; $[CD]$ et $[CD]_T$: la concentration en CD à l'équilibre et la concentration totale en CD, respectivement et K' la pente de la droite d'étalonnage.

Le tracé de A_0/A_{CD} en fonction de la concentration en CD donne une droite dont la pente est égale à K_f . Dans notre travail, nous avons appliqué un traitement algorithmique informatique pour

le traitement des données obtenues en chromatographie phase gazeuse. Les détails sur le logiciel sont donnés dans la section suivante (paragraphe III.3.1.2).

Dans notre travail, nous avons utilisé l'eau ou le tampon PBS comme matrice non chromatographiable. Pour la détermination de K_f , les solutions finales en invité sont préparées à partir des solutions éthanoliques de 10 000 ppm en présence de différentes concentrations de CD (0.5, 2, 4 et 7 mM) (Figure III.4).

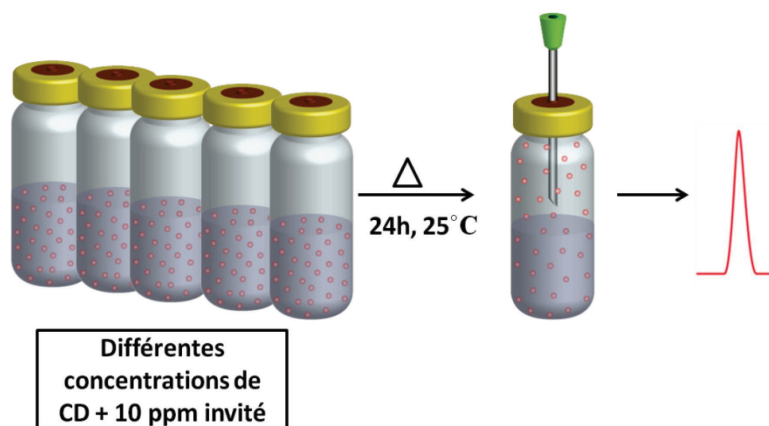


Figure III.4. Schéma du protocole expérimental pour la détermination de K_f en HS-CG.

Ces solutions ont été placées dans des vials de 22 mL. La concentration finale en éthanol ne dépasse pas 0,1 %. Les conditions chromatographiques sont identiques à celles utilisées durant la détermination de H_c et de la capacité de rétention.

III.3.1.1.2. Méthode rapide

La méthode dite « méthode rapide » est particulièrement adaptée pour la détermination des K_f de mélanges de composés. Cette méthode est applicable sur des mélanges complexes dont nous ne maîtrisons pas exactement les concentrations, comme les HEs. Quelques différences majeures existent entre cette méthode rapide et la méthode algorithmique. La méthode rapide permet d'accéder à la valeur de K_f à partir d'une concentration unique en CD et ne nécessite pas la connaissance de la concentration en invité. Cette méthode a été récemment développée dans notre laboratoire, en collaboration avec le professeur Gerhard Wenz de l'Université des Saarlandes (Allemagne) (Fourmentin *et al.*, 2013). En se basant sur la méthode de Benesi-Hildebrand (Benesi & Hildebrand, 1949) où la concentration en CD doit être supérieure à la concentration en invité, donc la concentration en CD à l'équilibre est considérée égale à la concentration totale en CD. La relation suivante s'établit:

$$K_f = \frac{[CD/I]}{[CD][I]} = \frac{[CD/I]}{[CD]_T[I]} \quad \text{III.9}$$

Avec $[CD/I]$, $[CD]$ et $[I]$: les concentrations à l'équilibre du complexe d'inclusion, de la CD et de l'invité, respectivement et $[CD]_T$: la concentration totale en CD.

Or $[CD/I]$ est proportionnelle à $A_0 - A_{CD}$ et $[I]$ à A_{CD} , alors K_f sera calculée à partir de la relation suivante :

$$K_f = \frac{\left(\frac{A_0}{A_{CD}} - 1 \right)}{[CD]_T} \quad \text{III.10}$$

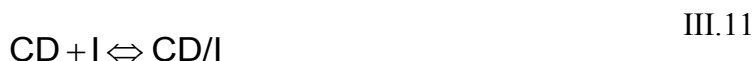
Avec A_0 et A_{CD} : les pics chromatographiques de chaque composé en absence et en présence de CD, respectivement.

Dans ce cas, nous avons utilisé une programmation de température pour pouvoir séparer, identifier et quantifier les différents composés présents dans les HEs. La programmation utilisée est la suivante : 50 °C pendant 2 min, puis une montée de température de 5 °C/ min jusqu'à 200 °C suivie d'un palier de 2 min. La durée totale d'analyse est de 34 min.

III.3.1.2. Traitement algorithmique

Le logiciel de calcul a été réalisé sous forme de fichier Excel. L'estimation de la valeur K_f se fait d'une façon automatique. L'avantage de l'application d'un traitement algorithmique repose sur le fait que cette méthode n'est basée sur aucune approximation et ne nécessite aucun étalonnage.

Le plus simple équilibre de complexation entre une CD et un invité peut s'écrire de la façon suivante :



La K_f du complexe est la résultante de la relation suivante :

$$K_f = \frac{[CD/I]}{[CD][I]} \quad \text{III.12}$$

A l'équilibre, les concentrations sont :

$$[I]_T = [I] + [CD/I] \quad \text{III.13}$$

$$[CD]_T = [CD] + [CD/I] \quad \text{III.14}$$

Avec $[I]_T$: la concentration totale en invité ; $[I]$: la concentration libre en invité ; $[CD]_T$: la concentration totale en CD ; $[CD]$: la concentration libre en CD ; $[CD/I]$: la concentration en complexe. Alors K_f sera égale à:

$$K_f = \frac{[CD/I]}{([CD]_T - [CD/I]) \cdot ([I]_T - [CD/I])} \quad \text{III.15}$$

En développant cette relation, une équation du second degré est obtenue :

$$[CD/I]^2 - ([CD]_T + [I]_T + 1/K_f) \cdot [CD/I] + [I]_T \cdot [CD]_T = 0 \quad \text{III.16}$$

La solution de cette équation sera:

$$[CD/I] = \frac{1}{2}([CD]_T + [I]_T + 1/K_f) - \frac{1}{2}\sqrt{([CD]_T^2 + [I]_T^2 + 1/K_f \cdot (2[CD]_T + 2[I]_T + 1/K_f) - 2[I]_T \cdot [CD]_T)} \quad \text{III.17}$$

Par conséquent, la concentration en complexe à l'équilibre $[CD/I]$ dépend uniquement des concentrations initiales en CD et en invité et de la valeur de K_f que nous sommes en train de calculer. La valeur de K_f sera par la suite calculée par un traitement algorithmique en introduisant au logiciel les valeurs expérimentales des pics chromatographiques. Cela est possible parce que l'aire du pic chromatographique est proportionnelle à la concentration de l'invité libre à l'équilibre. Ensuite, l'algorithme définit une valeur de K_f et des valeurs théoriques

des aires chromatographiques qui colleront le plus possible aux valeurs expérimentales. Un exemple de calcul de K_f est présenté dans le Tableau III.4.

Tableau III.4. Exemple de fichier Excel utilisé pour le calcul de K_f du complexe HP- β -CD/*trans*-anéthol dans l'eau.

1/ K_f	[I] _t	[CD] _t	[CD]/[I]*	Pourcentage de rétention	Aires expérimentales	Aires théoriques	acpm
0.0011	6.75E-05	0.00000	0.000000	0.0%	1406662.50	1406662.50	-434718846.0
		0.00050	0.000021	30.6%	979059.00	966596.65	167956884.7
K_f	921.853	0.00200	0.000043	64.3%	466440.00	482847.44	-812688638.6
écart	2.4E+15	0.00400	0.000053	78.4%	244539.00	280240.65	-1109229055.7
		0.00700	0.000058	86.5%	190991.00	164741.80	15085425.7

* La concentration en complexe [CD/I] est calculée selon l'équation III.17.

III.3.1.3. Résultats et discussion

La caractérisation des complexes d'inclusion nécessite de passer impérativement par une étape de détermination des valeurs de K_f . Nous observons une diminution des aires chromatographiques du *trans*-anéthol et de l'estragole avec la concentration de CD. Les résultats indiquent la formation des complexes de stœchiométrie 1:1 entre le *trans*-anéthol ou l'estragole et toutes les CDs étudiées ce qui se traduit par le fait que les valeurs d'aires expérimentales s'adaptent parfaitement à la courbe des aires théoriques pour chaque complexe. L'exemple du complexe CRYSMEB/estragole dans l'eau et dans le PBS est illustré dans la Figure III.5.

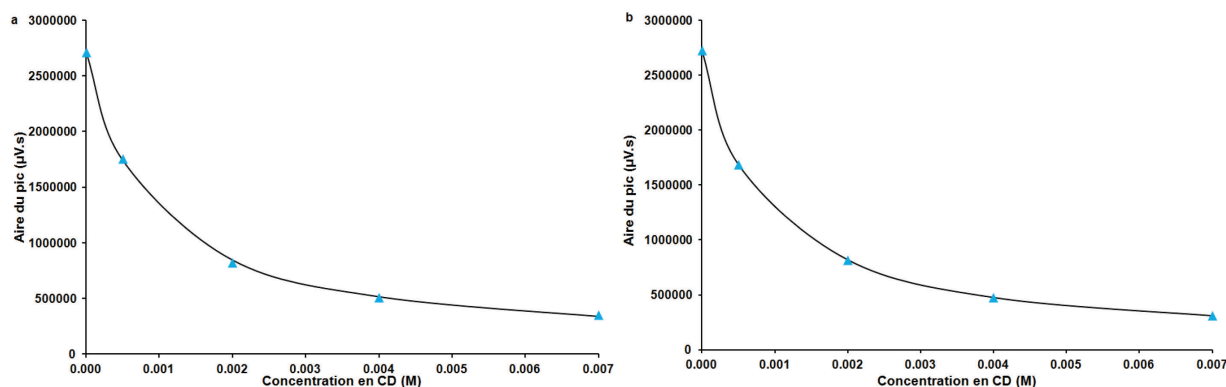


Figure III.5. Evolution de l'aire du pic avec la concentration en CD pour le complexe CRYSMEB/estragole dans a) l'eau ou b) le PBS: les valeurs expérimentales (▲) et théoriques (obtenues pour un complexe 1:1, ligne en continu).

Les K_f des complexes CD/*trans*-anéthol et CD/estragole sont calculées à l'aide du traitement algorithmique présenté précédemment. Les valeurs obtenues dans l'eau et dans le PBS sont présentées dans le Tableau III.5 en comparaison avec les valeurs de la littérature (Ciobanu *et al*, 2013a).

De la même manière que la constante de Henry (H_c), les valeurs de K_f obtenues dans l'eau et dans le PBS sont du même ordre de grandeur. Par conséquent, dans la suite de cette étude, l'eau sera utilisée pour la préparation et la caractérisation des complexes d'inclusion.

Tableau III.5. Constantes de formation (M^{-1}) obtenues par HS-CG dans l'eau ou le PBS à 25 °C. Ecart type < 10%.

CD	$K_f (M^{-1})$			
	<i>trans</i> -Anéthol		Estragole	
	Eau	PBS	Eau	PBS
α -CD	710, 1163 ^a	957	478	418
β -CD	497, 630 ^a	441	939	992
HP- β -CD	981, 1042 ^a	1083	1581	1300
RAMEB	1110, 1553 ^a	1209	1761	1527
CRYSMEB	877, 740 ^a	759	1661	1436

^aCiobanu *et al*, 2013a

Comme nous pouvons le constater dans le Tableau III.5., la K_f du complexe α -CD/*trans*-anéthol est relativement plus élevée que celle du complexe α -CD/estragole alors que la β -CD et ses dérivés forment des complexes plus stables avec l'estragole. La seule différence entre ces deux molécules est la position de la double liaison dans la chaîne propényle (Tableau III.1). Cela montre que la plus petite cavité de l' α -CD est adéquate pour inclure le *trans*-anéthol alors que la β -CD et ses dérivés possèdent une meilleure capacité d'encapsulation de l'estragole. Les résultats obtenus sont cohérents avec les seules valeurs rapportées dans la littérature par Ciobanu et ses collègues sur les K_f des complexes CD/*trans*-anéthol dans l'eau (Ciobanu *et al*, 2013a). Aucune valeur de K_f n'a été trouvée dans la littérature pour des complexes entre les CDs et le *trans*-anéthol dans le PBS et les CDs et l'estragole dans l'eau et dans le PBS.

Nous avons également utilisé la méthode rapide (Fourmentin *et al*, 2013) pour la détermination des K_f des complexes d'inclusion de l'estragole présent dans deux HEs : l'HE de basilic (*Ocimum basilicum* var. *basilicum*) et l'HE d'estragon (*Artemisia dracuncululus*) (Kfoury

et al, 2015). Les valeurs de K_f de l'estragole déterminées suivant la méthode rapide dans les deux HEs selon l'équation III.10 sont présentées dans le Tableau III.6. Les valeurs de K_f sont cohérentes avec celles obtenues par la méthode algorithmique (Tableau III.5). Cela met en évidence la pertinence de cette méthode rapide qui permet de déterminer la valeur de K_f en une seule analyse et montre qu'elle est bien adaptée à l'étude des interactions entre les CDs et les invités présents dans les HEs.

Tableau III.6. K_f (M^{-1}) des complexes d'inclusion de l'estragole dans les HEs de basilic et d'estragon obtenues par la méthode rapide. Ecart type < 10%.

	K_f CD/estragole (M^{-1})				
	α -CD	β -CD	HP- β -CD	RAMEB	CRYSMEB
dans le basilic	527	1140	1318	1903	1622
dans l'estragon	250	1037	1342	1603	1231

III.3.2. Détermination des constantes de formation par UV-Visible

III.3.2.1. Méthodologie

Dans le cadre de notre travail, nous avons appliqué cette méthode pour caractériser les complexes d'inclusion des composés non volatils (qui ne peuvent pas être analysés par HS-CG) mais également des invités volatils. Cela nous permettra d'effectuer une comparaison bi-technique des K_f obtenues.

La détermination quantitative des K_f des complexes nécessite généralement la réalisation d'une titration. Cette technique consiste à observer les variations spectrales obtenues pour l'invité car les CDs ne présentent pas de chromophore. En présence de CD, l'absorbance de la solution dépend à la fois de l'absorption molaire de l'invité (I) et du complexe ainsi que de leurs concentrations à l'équilibre :

$$\text{Abs} = \text{Abs}_I + \text{Abs}_{\text{CD/I}} = l(\varepsilon_I \cdot [I] + \varepsilon_{\text{CD/I}} \cdot [\text{CD/I}]) \quad \text{III.18}$$

Avec Abs : l'absorbance ; l : la largeur de la cuve utilisée (cm) ; [I] et [CD/I] : les concentrations de la molécule invitée et du complexe (M) ; et ε_I et $\varepsilon_{\text{CD/I}}$: les coefficients d'absorptivité molaire ($M^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) à la longueur d'onde λ à laquelle les mesures sont réalisées.

L'absorbance de la solution varie selon le coefficient d'absorption molaire de l'invité (ε_I). L'absorbance de la solution comprenant la CD et l'invité sera plus forte que celle de l'invité seul

si le coefficient d'absorption molaire de l'invité est inférieur à celui du complexe ($\epsilon_{CD/I}$) et vice versa. Dans notre étude, nous avons étudié le processus de complexation selon le principe de compétition. Le compétiteur utilisé est l'orange de méthyle (MO) (Figure II.6). La Figure III.6 conceptualise les équilibres mis en jeu durant la caractérisation d'un complexe CD/invité via l'observation d'un complexe CD/MO.

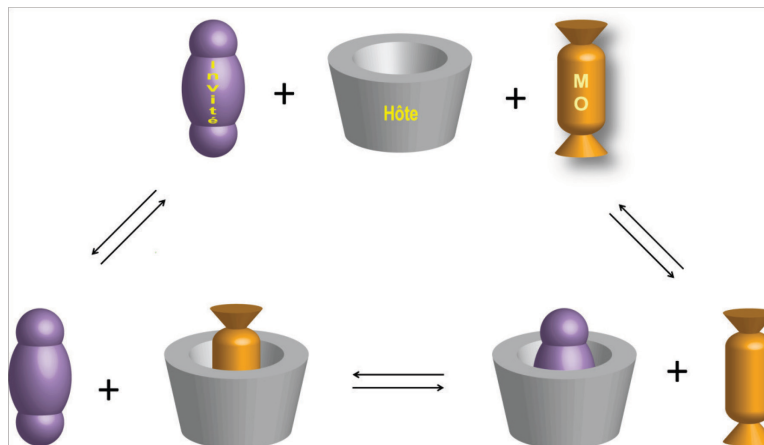


Figure III.6. Equilibres entre la CD, l'orange de méthyle (MO) et l'invité.

Le MO est l'un des indicateurs colorés les plus utilisés en UV-Visible dans l'étude des complexes d'inclusion avec les CDs. L'intérêt de ce compétiteur est qu'il présente une forte différence entre l'absorptivité de sa forme libre et de sa forme complexée dans le domaine du visible. De plus le MO présente de fortes interactions avec les CDs, et ses complexes sont largement étudiés et caractérisés dans la littérature (Decock *et al*, 2006 ; Landy *et al*, 2000). L'application de la méthode par compétition implique la caractérisation préalable des complexes CD/MO par une simple méthode de titration. Cette dernière consiste à suivre l'absorbance du MO en variant la concentration de CD. C'est une étape cruciale avant de procéder à la méthode par compétition ou de déplacement spectral.

Pour la méthode par compétition, nous observons les variations spectrales successives du MO sous l'addition de CD puis de la molécule invitée. Dans une solution de MO à 0,1 mM, les CDs sont dissoutes à des concentrations finales de 0,5 mM pour la β -CD et de 0,2 mM pour l' α -CD, l'HP- β -CD, la RAMEB et la CRYSMEB (Figure III.7).

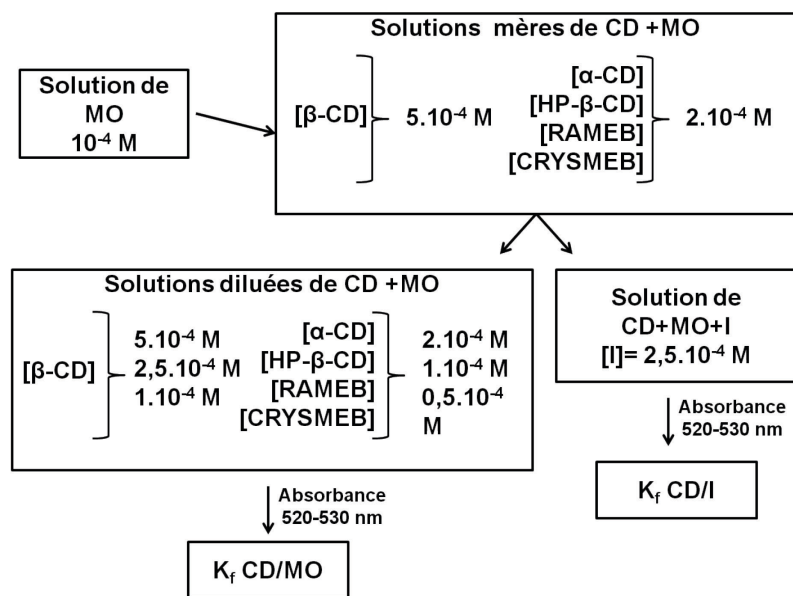


Figure III.7. Protocole expérimental pour la détermination de K_f en spectroscopie UV-Visible par la méthode de compétition.

Ensuite, la molécule invitée est dissoute dans un volume approprié de la solution de (MO + CD). Les solutions obtenues sont mises à l'équilibre à 25 °C. Les spectres sont enregistrés à l'aide d'un spectromètre « Perkin Elmer Lambda 2S » entre 520 et 530 nm ce qui correspond à l'intervalle optimale où le MO présente une différence d'absorption significative entre la forme libre et complexée (Landy *et al*, 2000).

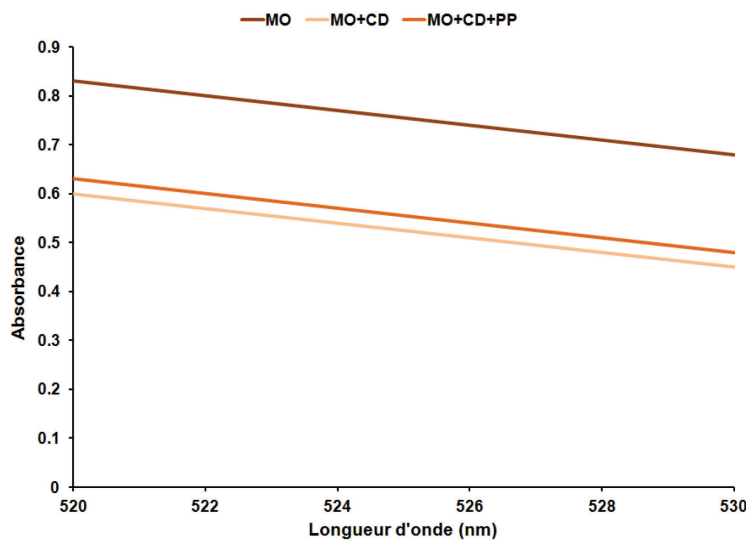


Figure III.8. Evolution spectrale du MO lors de la compétition.

Une étape cruciale consiste à déterminer la K_f du complexe CD/MO par une simple méthode de titration directe où l'évolution spectrale de l'absorbance du MO est suivie en présence de différentes concentrations en CD. L'absorbance mesurée des solutions MO+CD+I est définie par la relation suivante:

$$\text{Abs} = l ([\text{MO}] \epsilon_{\text{MO}} + [\text{CD/MO}] \epsilon_{\text{CD/MO}}) \quad \text{III.19}$$

Le calcul de la valeur de K_f du complexe CD/MO par la méthode de titration et l'enregistrement préalable des spectres des solutions MO, MO+CD et MO+CD+I permettent la détermination de K_f des complexes CD/I. Nous observons une augmentation de l'absorbance du MO suite à l'addition de l'invité à la solution CD+MO (Figure III.8). Cela est dû à l'expulsion des molécules de MO de la cavité de CD. Ces molécules expulsées sont remplacées par les molécules de l'invité qui sont incluses dans la cavité de CD.

Les données issues des différences spectrales sont traitées par une combinaison de deux algorithmes.

III.3.2.2. Traitement algorithmique

Le traitement des données obtenues par la méthode de compétition exige le couplage de deux algorithmes pour aboutir à la valeur de K_f .

Un premier algorithme postule une valeur de K_f pour le complexe CD/I et calcule les concentrations des complexes CD/MO et CD/I selon l'équation III. 17 en considérant MO et I (I étant le PP dans notre travail) comme invités respectifs. Les $[\text{CD/MO}]$ et $[\text{CD/I}]$ sont alors deux quantités interdépendantes qui sont calculées par la prise en compte d'une manière itérative les deux équilibres de complexation. La résolution en est donc numérique.

Un deuxième algorithme calcule l'absorbance théorique à partir des concentrations précédemment estimées selon l'équation suivante :

$$\text{Abs} = [\text{CD/MO}] (\epsilon_{\text{CD/MO}} - \epsilon_{\text{MO}}) + [\text{MO}]_T \epsilon_{\text{MO}} \quad \text{III.20}$$

La largeur de la cuve utilisée (l) étant de 1 cm.

L'algorithme répète cette procédure en faisant varier à chaque fois la valeur de K_f postulée, jusqu'à ce que l'absorbance théorique se colle avec l'absorbance expérimentale :

Etape 1 : l'algorithme postule une valeur de K_f pour le complexe CD/I

Etape 2 : l'algorithme calcule la concentration $[CD/MO]_n$ à partir de la relation (1) en considérant que $[CD]_D = [CD]_T$

Etape 3 : l'algorithme calcule la concentration $[CD/I]_n$ à partir de la relation (2) en considérant que $[CD]_D = [CD]_T - [CD/MO]_n$

Etape 4 : l'algorithme calcule la concentration $[CD/MO]_{n+1}$ à partir de la relation (1) en considérant que $[CD]_D = [CD]_T - [CD/I]_n$

Etape 5 : l'algorithme lance une comparaison des deux concentrations successives $[CD/MO]_n$ et $[CD/MO]_{n+1}$

Si $[CD/MO]_{n+1} \neq [CD/MO]_n \Rightarrow [CD/MO]_n$ prend la valeur de $[CD/MO]_{n+1} \Rightarrow$ la procédure retourne à l'étape 3.

Si $[CD/MO]_{n+1} = [CD/MO]_n \Rightarrow$ respect de la coexistence des deux équilibres \Rightarrow la procédure passe à l'étape 6.

Etape 6 : l'algorithme calcule l'absorbance théorique de la solution CD+MO+I à partir de la relation (3), sur la base des concentrations obtenues à l'étape 5.

Etape 7 : l'algorithme compare des absorbances théoriques et observées :

Si Abs théorique \neq Abs observée \Rightarrow la valeur postulée pour la valeur de K_f du complexe CD/I n'est pas valable donc une nouvelle valeur est postulée pour la K_f du complexe CD/I et la procédure reprend à l'étape 1.

Si Abs théorique = Abs observée \Rightarrow La K_f est égale à la valeur postulée.

La Figure III.9. montre un exemple du fichier utilisé dans le calcul de K_f .

a							
MO total	N° solution	CDT	A exp	A théo	CDT	[CD/MO]	% [CD/MO]
0.0001	0	0.00000	3.286	3.286	0.00000	0.00000	0.0%
	1	0.00005	2.954	2.957	0.00005	0.00003	26.6%
	2	0.00010	2.728	2.721	0.00010	0.00005	45.7%
	3	0.00020	2.455	2.455	0.00020	0.00007	67.2%
erreur 0.005	nombre 1000	nombre 3					

b						
[MO]	N° solution	CDT	A exp	CD exp	It calc	It reel
0.0001	1	0.00020	2.506	0.00011	2.E-04	3.E-04
erreur 0.005	nombre 1000	nombre 1				

Figure III.9. a) Premier et b) deuxième algorithme utilisés pour le calcul de K_f par la méthode de compétition. Exemple du système RAMEB/MO/acide *p*-coumarique.

Cette méthodologie permet une détermination fiable et précise des K_f . Les K_f des complexes d'inclusion calculés par cette technique sont de vraies constantes de stabilité et non pas des constantes apparentes.

III.3.2.3. Résultats et discussion

L'étude par spectroscopie UV-Visible en appliquant la méthode par compétition nous permet de déterminer la stœchiométrie et de calculer les K_f de complexes d'inclusion. Dans notre travail, nous avons utilisé cette technique pour calculer les valeurs de K_f des complexes d'inclusion des CDs avec 7 PPs (*trans*-anéthol, estragole, eugénol, isoeugénol, acide caféique, acide *p*-coumarique et acide férulique). Nous observons que tous les complexes étudiés sont de stœchiométrie 1:1 (CD:PP). Les valeurs de K_f calculées sont présentées dans le Tableau III.7.

Nos valeurs sont en accord avec les valeurs observées dans la littérature pour le MO et les autres composés (Anselmi *et al*, 2008 ; Ciobanu *et al*, 2013a ; Decock *et al*, 2006 ; Decock *et al*, 2008 ; Divakar *et al*, 1997 ; Gornas *et al*, 2009 ; Zhan *et al*, 2008 ; Zhang *et al*, 2009a ; 2009b). De plus, les valeurs de K_f des complexes d'inclusion de toutes les CDs avec le *trans*-anéthol et l'estragele sont en bon accord avec ceux obtenus par HS-CG.

Tableau III.7. Constantes de formation (M^{-1}) obtenues par spectroscopie UV-Visible en comparaison avec des valeurs de la littérature. Ecart type < 10%.

Invité	Kf CD/invité (M^{-1})				
	α -CD	β -CD	HP- β -CD	RAMEB	CRYSMEB
MO	7810	2386	5597	15400	3594
<i>trans</i> -Anéthol	927, 1163 ^a	542, 630 ^a	845, 740 ^a	1815, 1553 ^a	1039, 1042 ^a
Estragole	335	987	1508	1916	1584
Eugénol	350, 94 ^b	462, 264 ^b , 357 ^c , 322 ^d	436, 462 ^b , 445 ^d	568 ^b , 521 ^d	454 ^b , 401 ^d
Isoeugénol	178, 85 ^b	364, 255 ^b , 304 ^d	418, 441 ^b , 452 ^d	514 ^b , 547 ^d	263 ^b , 240 ^d
Acide caféique	1540	318, 278 ^e , 516 ^f	526, 279 ^g	991	404
Acide <i>p</i> -coumarique	1816	338	787	1030	668
Acide férulique	1769, 1162 ^h	246, 205 ⁱ	451, 590 ⁱ	908	474

^aCiobanu *et al*, 2013a; ^bDecock *et al*, 2008; ^cZhan *et al*, 2008; ^dDecock *et al*, 2006; ^eGornas *et al*, 2009;

^fDivakar *et al*, 1997; ^gZhang *et al*, 2009a ; ^hAnselmi *et al*, 2008 ; ⁱZhang *et al*, 2009b.

L'ensemble des valeurs, de K_f se trouvent dans l'intervalle 200-5000 M^{-1} . Suivant la littérature, cet intervalle est approprié, pour l'augmentation de la biodisponibilité des invités faiblement solubles dans les phases aqueuses (Vandelli *et al*, 2000).

Nous pouvons diviser les résultats obtenus en deux cas. Le premier cas concerne l' α -CD. Les complexes d'inclusion de l' α -CD avec le *trans*-anéthol, l'acide caféique, l'acide *p*-coumarique et

l'acide férulique présentent des valeurs élevées de K_f . Le deuxième cas concerne la β -CD et ses dérivés, pour lesquelles les K_f des complexes d'inclusion sont généralement plus élevées avec l'estragole, l'eugénol et l'isoeugénol (Figure III.10).

Cela peut s'expliquer par le fait que le *trans*-anéthol, l'acide caféique, l'acide *p*-coumarique et l'acide férulique possèdent des structures relativement rigides dues à la présence de la double liaison conjuguée avec le cycle aromatique. Cette conjugaison confère à ces composés une structure allongée et planaire et ils peuvent, par conséquent, mieux s'inclure dans la petite cavité de l' α -CD. Par contre, les autres invités (l'estragole, l'eugénol) sont plus encombrants à cause de la libre rotation de la double liaison autour de la liaison C-C. L'encombrement stérique des invités limite leur inclusion dans l' α -CD et leur permet d'être mieux reconnues par la cavité de la β -CD et ses dérivés.

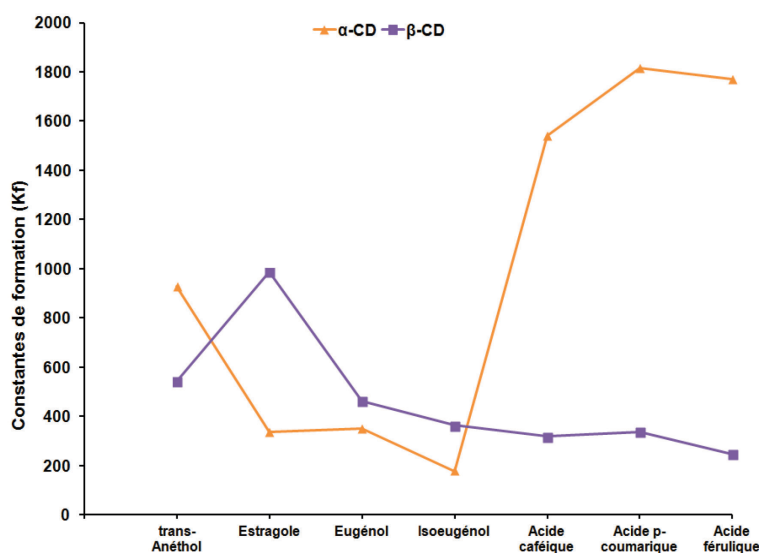


Figure III.10. Constantes de formation obtenues avec l' α -CD et la β -CD .

Il faut noter que l'isoeugénol est un mélange de deux isomères, *cis* et *trans*, ce qui peut expliquer les différences observées pour ce composé. La K_f du complexe α -CD/isoeugénol est en fait une valeur moyenne des K_f des complexes α -CD/*cis*-isoeugénol et α -CD/*trans*-isoeugénol. Les isomères *cis* sont généralement plus encombrants que les isomères *trans* et forment des complexes d'inclusion ayant une plus faible stabilité (Valente & Söderman, 2014).

En comparant les valeurs de K_f de la β -CD et de ses dérivés entre elles, il s'avère que la RAMEB présente la meilleure affinité vis-à-vis des invités à l'exception de l'eugénol et

l'isoeugénol, pour lesquels nous n'observons pas une forte discrimination entre les différents CDs à cause de leur solubilité relativement élevée.

Nous avons analysé la corrélation entre les K_f obtenues avec la β -CD et celles de la RAMEB (Figure III.11). Une corrélation satisfaisante a été obtenue. Cela indique que la modification chimique de la β -CD native, notamment la méthylation, permet d'accroître l'affinité de la CD envers l'invité en augmentant le caractère hydrophobe de la cavité. De plus, les groupements méthyles sont moins encombrants que les chaînes hydroxypropyles présents dans la structure de l'HP- β -CD (Danel *et al*, 2013).

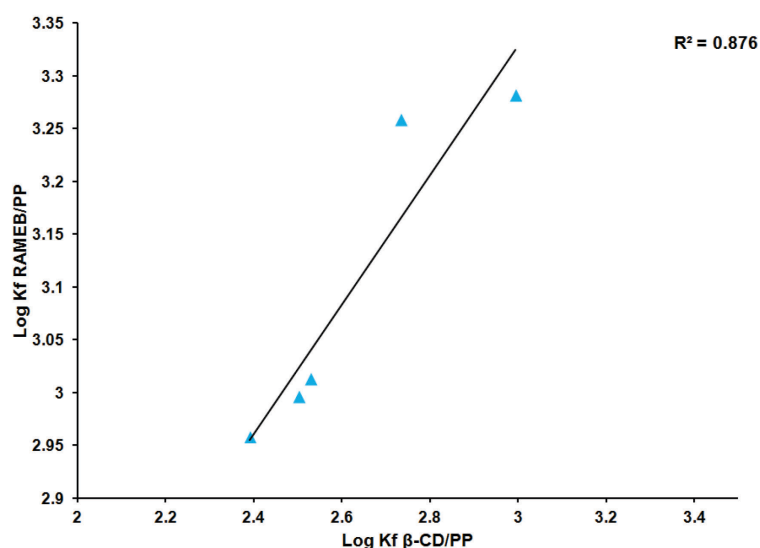


Figure III.11. Représentation graphique de corrélation entre les valeurs de K_f de RAMEB/PP et celles de β -CD/PP.

En ce qui concerne le degré de substitution du noyau aromatique, nous avons remarqué que les invités *p*-substitués (*trans*-anéthol, estragole et acide *p*-coumarique) ont tendance à former des complexes plus stables en les comparant avec leurs homologues *o,p*-disubstitués (eugénol, isoeugénol, acide caféique et acide férulique) (Figure III.12 ; Tableau III.6). L'encombrement stérique augmente avec la substitution ce qui entraîne une gêne stérique lors de l'approche de l'invité de la cavité de CD et réduit l'affinité entre les deux espèces.

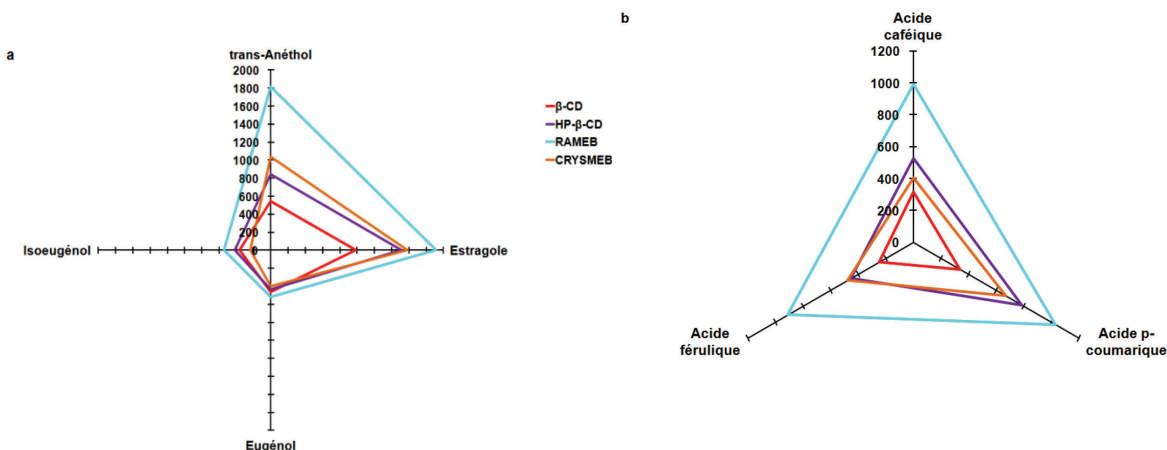


Figure III.12. Comparaison des K_f des invités *p*- substitués et leurs homologues *o,p*-disubstitués : a) *trans*-anéthol, estragole, eugénol et isoeugénol et b) acide *p*-coumarique, acide caféique et acide férulique.

D'autres études ont également été réalisées sur l'influence de la complémentarité entre l'invité et la cavité de la CD sur la stabilité du complexe (K_f). Les auteurs ont aussi montré l'importance de la conformation structurale et l'accommodation géométrique dans la formation et la stabilité des complexes d'inclusion (Fourmentin *et al*, 2013).

Comme la stabilisation des complexes d'inclusion est liée à la structure stérique de l'invité mais également à sa nature hydrophobe nous avons essayé de trouver une corrélation éventuelle entre les K_f des complexes d'inclusion et le caractère hydrophobe des invités mesuré par le LogP (coefficient de partage d'un composé entre l'octanol et l'eau). Aucune corrélation n'a été observée tandis que dans la littérature, quelques études ont rapporté une corrélation entre la stabilité du complexe d'inclusion et l'hydrophobicité de l'invité (Astray *et al*, 2010 ; Demian *et al*, 2000 ; Kfoury *et al*, 2014). Ces résultats montrent que la complémentarité stérique entre la CD et l'invité a également un effet prédominant sur la formation du complexe d'inclusion.

III.4. Etude de phase de solubilité

Les études de phase de solubilité permettent d'apporter des informations sur les K_f mais également sur l'augmentation de la solubilité apparente des invités et l'efficacité de complexation (CE) ou de solubilisation des CDs.

III.4.1. Méthodologie

Un excès d'invité est ajouté à des solutions de CD à des concentrations allant de 0 à 10 mM. Une solution ne contenant pas de CD est utilisée pour déterminer la solubilité aqueuse intrinsèque (S_0) de l'invité. Les mélanges sont ensuite agités à 25 °C pendant 24 h puis filtrés (0,45 μ m) pour retenir tout excès d'invité insoluble. Les filtrats sont ensuite analysés en spectroscopie UV-Visible. Les longueurs d'onde maximales des invités utilisés dans l'analyse sont présentées dans le Tableau III.8.

Tableau III.8. Longueurs d'onde maximales utilisées en spectroscopie UV-Visible.

Invité	λ max (nm)
<i>trans</i> -Anéthol	258
Estragole	225
Eugénol	280
Isoeugénol	261
Acide caféique	327
Acide <i>p</i> -coumarique	311
Acide férulique	325

Les profils de phase de solubilité sont obtenus en rapportant sur un graphique la solubilité de l'invité en fonction de la concentration en CD. Dans le cas d'un complexe de stœchiométrie 1:1, donc du diagramme de solubilité linéaire (Voir paragraphe II.7.1.3, chapitre II), nous pouvons calculer les valeurs de K_f , CE, le rapport molaire optimal (PP : CD) et l'augmentation du volume de formulation (AVF) suivant les équations II.1, II.2, II.3 et II.4, respectivement.

III.4.2. Résultats et discussion

Les études de phase de solubilité ont été menées selon la méthodologie décrite par Higuchi et Connors (Higuchi & Connors, 1965). La concentration totale en invité solubilisé dans les solutions de CD a été déterminée au moyen de la spectroscopie UV-Visible à la longueur d'onde optimale de chaque PP. Comme la complexation peut affecter l'absorption de l'invité, le filtrat doit être dilué dans l'éthanol avant d'être analysé pour décomplexer les invités et s'affranchir de l'effet de CD (Wang & Brusseau, 1993). Les profils de phase de solubilité ont été établis en tracant la solubilité apparente des invités en fonction de la concentration en CD. Les profils de phase de solubilité obtenus sont présentés dans la Figure III.13.

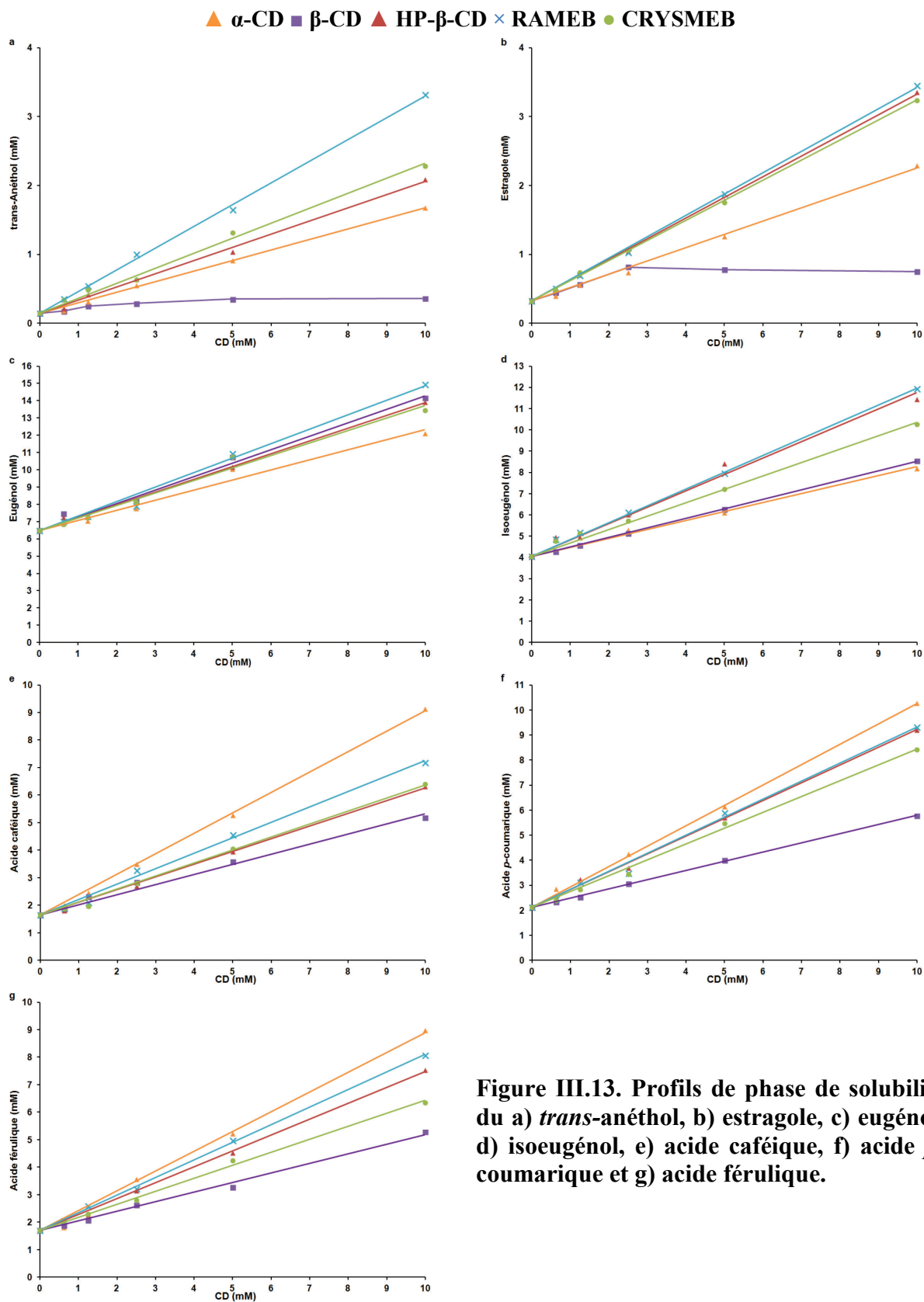


Figure III.13. Profils de phase de solubilité du a) *trans*-anéthol, b) estragole, c) eugénol, d) isoeugénol, e) acide caféique, f) acide *p*-coumarique et g) acide férulique.

A la vue des profils de phase de solubilité obtenus, nous pouvons remarquer que la solubilité aqueuse apparente des PP augmente généralement d'une façon linéaire avec la concentration en CD dans le domaine des concentrations étudiées (courbes de type A_L). Les exceptions à cette tendance sont les complexes de la β -CD avec le *trans*-anéthol et l'estragole (courbes de type B).

La linéarité observée, est attribuée à la formation de complexes d'inclusion solubles. Quant aux complexes β -CD/*trans*-anéthol et β -CD/estragole, la solubilité de ces deux PP n'augmente que jusqu'à une certaine concentration en CD. Cela peut s'expliquer par la faible solubilité aqueuse de la β -CD ainsi que par celle du *trans*-anéthol et de l'estragole. D'après la littérature, la β -CD forme généralement des complexes ayant une solubilité limitée, surtout avec les invités très peu solubles dans l'eau (Loftsson *et al*, 2007). Cela montre que la β -CD a une efficacité limitée pour la complexation de ce type de composés ce qui restreint son utilisation.

Une pente inférieure à l'unité est obtenue pour tous les profils A_L et pour la portion linéaire des profils de type B. Cela confirme la formation des complexes de stœchiométrie 1:1 (CD:PP) en accord avec nos résultats précédents.

Les K_f de ces complexes 1:1 sont calculées à partir de la valeur de la pente des profils A_L et de la portion linéaire des profils B ainsi que de la solubilité intrinsèque (S_0) des PP déterminée dans l'eau conformément à l'équation II.1 (Higuchi & Connors, 1965). Le Tableau III.9 regroupe les résultats obtenues à partir des diagrammes de phase de solubilité.

Tableau III.9. Valeurs de K_f (M^{-1}), solubilité (mg/l) des PP, augmentation de la solubilité S_t/S_0 , efficacité de complexation (CE), rapport molaire optimal (PP:CD) et augmentation du volume de la formulation (AVF) des PP. obtenus à partir des diagrammes de phase de solubilité

PP	S_0	CD	K_f	S_t/S_0^*	CE	PP:CD	AVF
<i>trans</i> -Anéthol	22	α -CD	1274	11	0,19	1:6,38	42
		β -CD	537	3	0,08	1:13,75	106
		HP- β -CD	1510	14	0,22	1:5,54	56
		RAMEB	2157	17	0,31	1:4,18	38
		CRYSMEB	1782	15	0,26	1:4,84	40
Estragole	48	α -CD	682	4	0,22	1:5,54	36
		β -CD	882	3	0,28	1:4,51	35
		HP- β -CD	1412	11	0,46	1:3,19	32
		RAMEB	1694	12	0,55	1:2,83	26
		CRYSMEB	1512	10	0,41	1:3,05	25
Eugénol	1038	α -CD	246	2	1,56	1:1,64	10
		β -CD	513	2.1	3,25	1:1,31	9
		HP- β -CD	445	2.2	2,81	1:1,36	12
		RAMEB	550	2.2	3,48	1:1,29	11
		CRYSMEB	440	2.1	2,78	1:1,36	10
Isoeugénol	665	α -CD	110	2	0,45	1:3,24	19
		β -CD	210	1,5	0,85	1:2,18	15
		HP- β -CD	449	2,7	1,82	1:1,55	14
		RAMEB	428	2,6	1,73	1:1,58	13
		CRYSMEB	312	2,5	1,26	1:1,79	13
Acide caféique	300	α -CD	1819	5,5	3,03	1:1,33	7
		β -CD	425	3,5	0,71	1:2,41	15
		HP- β -CD	534	3,8	0,89	1:2,12	18
		RAMEB	825	4,4	1,37	1:1,73	13
		CRYSMEB	552	3,8	0,92	1:2,09	14
Acide <i>p</i> -coumarique	344	α -CD	1988	4,8	4,17	1:1,24	7
		β -CD	306	2,8	0,64	1:2,56	18
		HP- β -CD	1099	4,4	2,30	1:1,43	13
		RAMEB	1228	4,4	2,57	1:1,39	11
		CRYSMEB	900	4	1,89	1:1,53	11
Acide férulique	333	α -CD	1737	5,2	2,98	1:1,34	7
		β -CD	326	3,1	0,56	1:2,79	16
		HP- β -CD	833	4,4	1,43	1:1,70	13
		RAMEB	1045	4,8	1,79	1:1,56	11
		CRYSMEB	512	3,8	0,88	1:2,14	13

* S_t et S_0 sont la solubilité de l'invité dans une solution de 10 mM de CD et dans l'eau, respectivement

Les K_f calculées à partir des profils de phase de solubilité sont considérées comme des constantes de formation apparentes, plutôt que de stabilité propre au complexe d'inclusion. A l'exception du *trans*-anéthol, les résultats sont du même ordre que ceux obtenus en HS-CG et UV-Visible (le complexe HP- β -CD/estragole a montré, par exemple, des valeurs de K_f égales à 1581 M^{-1} par HS-CG, 1508 M^{-1} par UV-Visible et 1412 M^{-1} par les études de phase de solubilité alors que les valeurs obtenues pour le complexe β -CD/*trans*-anéthol sont 981 M^{-1} , 845 M^{-1} et 1510 M^{-1} , respectivement). Cette différence importante (dans le cas du *trans*-anéthol) peut être due à des phénomènes de micellisations et d'agréations des molécules insolubles observés en plus des phénomènes de formation de complexes d'inclusion. Ces phénomènes conduisent le *trans*-anéthol à atteindre une concentration apparente plus élevée conduisant à une surestimation de la valeur de K_f des complexes d'inclusion. Cela est tout à fait cohérent avec la littérature et montre que moins la molécule invitée est soluble plus la K_f apparente est surévaluée (Loftsson *et al*, 2005). Il faut, de plus, toujours garder à l'esprit que ces profils de phase de solubilité ne permettent pas de déterminer si l'invité est vraiment inclut dans la cavité de la CD mais uniquement l'effet de la CD sur sa solubilité aqueuse (Loftsson & Brewster, 2010).

Les valeurs de K_f issues des études de phase de solubilité rencontrées dans la littérature sont reportées dans le Tableau III.10 (Demian, 2000 ; Garg *et al*, 2010; Hill *et al*, 2013; Starzisar *et al*, 2008 ; Wang *et al*, 2011).

Tableau III.10. Les valeurs trouvées dans la littérature des constantes de formation calculées par études de phase de solubilité.

PP	K_f CD/PP (M^{-1})	
	β -CD	HP- β -CD
<i>trans</i> -Anéthol	-	713 ^a
Eugénol	174 ^b	1206 ^c
Acide <i>p</i> -coumarique	49000 ^d	-
Acide férulique	-	166 ^e

^aDemian, 2000 ; ^bHill *et al*, 2013; ^cGarg *et al*, 2010; ^dStarzisar *et al*, 2008 ; ^eWang *et al*, 2011.

Une certaine disparité des résultats est observée. Cela peut être dû à la différence dans les conditions et protocoles expérimentaux. A notre connaissance, il n'y a pas de littérature sur les études de phase de solubilité des complexes CD/estragole et CD/isoegénol.

Un paramètre important lors des études de solubilisation est l'efficacité de complexation (CE) calculée conformément à l'équation II.2. Le CE est un paramètre indépendant de la solubilité de l'invité et de l'ordonnée à l'origine et permet de traduire le potentiel solubilisant des CDs. Les valeurs obtenues sont reportées dans le Tableau III.9.

Nous pouvons remarquer que dans le cas de la β -CD et ses dérivés, les moyennes de CE suivent la hiérarchie suivante : β -CD ($1,47 \pm 1,33$) < CRYSMEB ($1,62 \pm 1,30$) < HP- β -CD ($1,84 \pm 1,48$) < RAMEB ($2,12 \pm 1,62$). Ces observations confirment que les dérivés de la β -CD sont de meilleurs agents de solubilisation que la β -CD native. Le faible pouvoir solubilisant de la β -CD peut être dû au fait qu'elle peut former des complexes insolubles ou bien que les quantités d'invité solubilisées soient faibles et donc non détectables. De plus, les résultats montrent que la RAMEB possède le meilleur potentiel de solubilisation. Cela est tout à fait cohérent avec la littérature (Badr-Eldin *et al*, 2008 ; Loftsson *et al*, 2007).

En se basant sur le CE nous pouvons calculer le rapport molaire optimal (PP:CD) et l'augmentation du volume de la formulation (AVF) selon les équations II.3 et II.4, respectivement. Les valeurs obtenues sont reportées dans le Tableau III.9. Ces deux paramètres sont très utiles surtout pour la formulation des préparations pharmaceutiques incluant les CDs (Loftsson *et al*, 2005). Ils permettent d'estimer les quantités de CDs nécessaires pour la formulation des produits actifs ainsi que d'évaluer le volume de la formulation. En d'autres termes, ces deux facteurs reflètent la possibilité de formuler des molécules actives sous forme de complexes d'inclusion pour des visées pharmaceutiques ou autres. Il s'avère, à l'issue des résultats du Tableau III.9, que l' α -CD est la meilleure candidate pour la formulation des acides hydroxycinnamiques alors que pour les autres PPs les dérivés de la β -CD semblent être les meilleures.

La capacité de solubilisation des CDs a été aussi évaluée en termes de gain de solubilité (S_t/S_0) (Tableau III.8). Nos observations sont cohérentes avec la littérature. Les auteurs ont montré une augmentation de la solubilité de l'acide caféique environ de 3 et 4 fois en présence de 10 mM de β -CD et d'HP- β -CD, respectivement (Zhang *et al*, 2009a). Une autre étude montre une augmentation environ de 3 et 6 fois de la solubilité de l'acide férulique, respectivement, aux mêmes concentrations en CD (Zhang *et al*, 2009b). Liang et ses collaborateurs (2012) ont montré une augmentation de 4,72 fois de la solubilité de l'eugénol en présence de 50 mM de HP- β -CD.

Dans notre travail, nous avons remarqué que le gain de solubilité (S_t/S_0) en présence de 10 mM de CD suivait un classement inverse à celui des solubilités intrinsèques (S_0) des invités (Figure III.14).

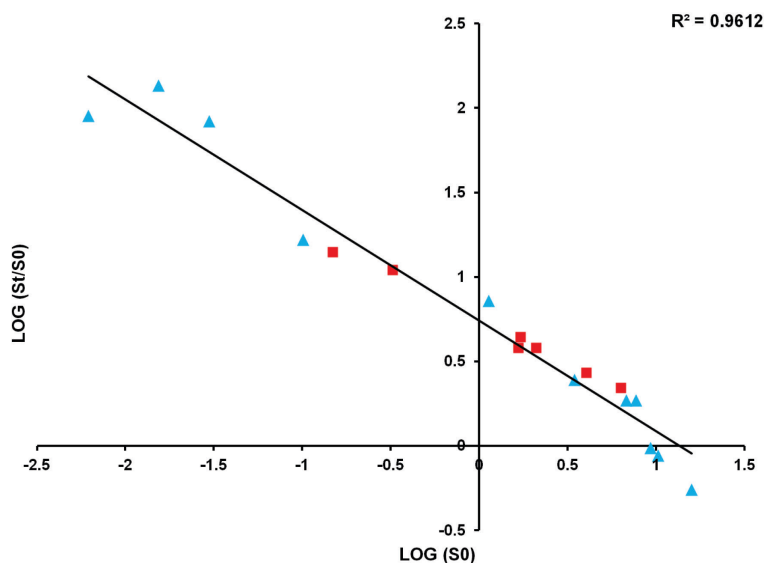


Figure III.14. Corrélation entre l'augmentation de solubilité ($\log S_t/S_0$) en présence de 10 mM d'HP- β -CD des phénylpropanoïdes étudiées ■ et d'autres produits aromatiques ▲ (Kfoury *et al*, 2014 ; Liang *et al*, 2012; Yuan *et al*, 2014; Zhang *et al*, 2009a).

Prenons le cas de l'HP- β -CD ; nous observons une corrélation linéaire entre le gain de solubilité ($\log S_t/S_0$) et la solubilité intrinsèque ($\log S_0$) des 7 PPs, de notre étude, ainsi que d'autres composés de la littérature (Kfoury *et al*, 2014 ; Liang *et al*, 2012; Yuan *et al*, 2014; Zhang *et al*, 2009a) (Figure III.14). Cela montre que l'influence de la S_0 de l'invité est prépondérante par rapport au pouvoir solubilisant des CDs ce qui conduit à une solubilisation plus importante des molécules pratiquement insolubles dans l'eau. Nos résultats confirment, comme nous l'avons évoqué, que les CDs sont capables d'augmenter considérablement la solubilité des PPs.

III.5. Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

III.5.1. Méthodologie

Nous nous sommes intéressés plus particulièrement à deux paramètres en ^1H RMN: le déplacement chimique (δ) et le temps de relaxation (T_1). Les spectres ^1H RMN ont été enregistrés sur des appareils Bruker Avance III spectrometer à 400 MHz à 25 °C (Résolution FID à 0,18Hz/point). Toutes les solutions ont été préparées dans l'eau deutérée D_2O à 99,98 %, filtrées et dégazées avant analyse. Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en ppm par rapport au pic du tétraméthylsilane (TMS). Les temps de relaxation (T_1) sont obtenus par la méthode conventionnelle « inversion recovery ».

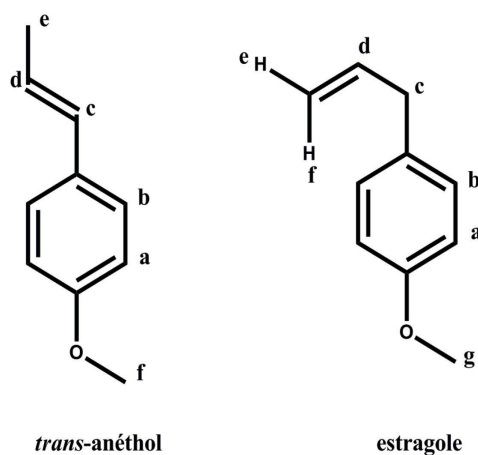
Les expériences 2D-ROESY ont été menées à 25 °C avec des temps de mélange de 600 ms durant le spin-lock en utilisant la méthode « States-TPPI ». Toutes les solutions ont été préparées et laissées 24 h à l'équilibre.

III.5.2. Résultats et discussion

La spectroscopie RMN est un outil remarquable pour l'étude des phénomènes d'inclusion ou d'encapsulation. Les interactions entre les invités et la cavité de la CD peuvent être confirmées par ^1H RMN. En effet, cette technique est basée généralement sur l'observation des déplacements chimiques (δ). Mais si l'inclusion des molécules dans la cavité des CDs perturbe les déplacements chimiques (δ), l'incidence de ce phénomène sur la mobilité des espèces est aussi observable. La spectroscopie RMN est la seule technique qui offre la possibilité de suivre les réponses spectrales des deux espèces présentes simultanément en solution.

En partant de ce principe, nous avons étudié les variations des déplacements chimiques ($\Delta\delta$) et des temps de relaxation (ΔT_1) de la CD et de l'invité sous forme libre et complexée dans l'eau deutérée. Cette technique est surtout basée sur le fait que l'inclusion d'un invité dans la cavité d'une CD induit des variations des déplacements chimiques (δ) des protons situés à l'intérieur de la cavité (H-3 et H-5). Ces variations couplées à celles de l'invité permettent de confirmer la formation ou non d'un complexe d'inclusion et également d'en établir la géométrie (Piel *et al*, 2004).

La spectroscopie ^1H RMN a été employée dans notre travail pour montrer et étudier le phénomène d'inclusion du *trans*-anéthol et de l'estragole dans la β -CD. La structure de ces deux PPs est représentée dans la Figure III.15.

Figure III.15. Structure du *trans*-anéthol et de l'estragele.

Les variations de $\Delta\delta$ et $\Delta T1$ de la β -CD, du *trans*-anéthol et de l'estragele sont reportées dans les tableaux III.11 et III.12, respectivement.

Tableau III.11. Attributions et variations des déplacements chimiques (δ) et des temps de relaxation ($T1$) des protons de la β -CD et du *trans*-anéthol sous la forme libre ou complexée.

^1H	$\delta(\text{ppm})$		$\Delta\delta$ (ppm)	$T1$ (S)		$\Delta T1(\text{S})$
	β -CD libre	Complexe		β -CD libre	Complexe	
H-1	5,074	5,045	-0,029	0,760	0,721	-0,039
H-2	3,651	3,625	-0,026	1,117	1,174	0,057
H-3	3,968	3,919	-0,049	1,249	1,254	0,005
H-4	3,587	3,564	-0,023	0,752	0,787	0,035
H-5	3,880	3,791	-0,089	0,481	0,711	0,230
H-6	3,880	3,847	-0,033	0,481	0,420	-0,061
^1H	$\delta(\text{ppm})$		$\Delta\delta$ (ppm)	$T1$ (S)		$\Delta T1(\text{S})$
	<i>trans</i> -anéthol libre	Complexe		<i>trans</i> -anéthol libre	Complexe	
H-a	6,364	6,926	0,562	1,536	1,251	-0,285
H-b	6,767	7,296	0,529	1,274	1,021	-0,253
H-c	5,896	6,376	0,480	1,500	0,942	-0,558
H-d	5,601	6,168	0,567	1,270	0,755	-0,515
H-e	1,410	1,846	0,436	0,876	0,936	0,060
H-f	3,154	3,844	0,690	1,217	0,672	-0,545

Tableau III.12. Attributions et variations des déplacements chimiques (δ) et des temps de relaxation (T1) des protons de la β -CD et de l'estrageole sous la forme libre ou complexée.

^1H	$\delta(\text{ppm})$		$\Delta\delta (\text{ppm})$	T1 (S)		$\Delta\text{T1(S)}$
	β -CD libre	Complexe		β -CD libre	Complexe	
H-1	5,074	5,043	-0,031	0,760	0,783	0,023
H-2	3,651	3,623	-0,028	1,117	1,258	0,141
H-3	3,968	3,891	-0,077	1,249	1,297	0,048
H-4	3,587	3,564	-0,023	0,752	0,702	-0,050
H-5	3,880	3,721	-0,159	0,481	0,617	0,136
H-6	3,880	3,834	-0,046	0,481	0,442	-0,039

^1H	$\delta(\text{ppm})$		$\Delta\delta (\text{ppm})$	T1 (S)		$\Delta\text{T1(S)}$
	Estragole libre	Complexe		Estragole libre	Complexe	
H-a	6,411	6,928	0,517	0,688	1,222	0,534
H-b	6,651	7,156	0,505	0,871	1,288	0,417
H-c	2,881	3,336	0,455	0,723	0,850	0,127
H-d	5,559	6,013	0,454	0,519	1,095	0,576
H-e	4,658	4,984	0,326	/	/	/
H-f	4,692	5,086	0,394	/	/	/
H-g	3,170	3,807	0,637	0,880	0,676	-0,204

Aucun nouveau pic n'est apparu dans les spectres des complexes d'inclusion. Cela montre que la complexation est un processus rapide. Pour le complexe β -CD/*trans*-anéthol, en présence du *trans*-anéthol, les protons de la CD montrent une variation des déplacements chimiques (δ) vers les hauts champs.

Les variations des déplacements chimiques (δ) des protons H-3 et H-5, situés à l'intérieur de la cavité hydrophobe, en plus du proton H-6 localisé au niveau de l'entrée étroite de la cavité sont plus importants que ceux des protons H-1, H-2, et H-4 situés à l'extérieur de la CD. Ces variations des déplacements chimiques sont causées par l'effet anisotropique issu de l'inclusion des groupements riches en électrons- π du *trans*-anéthol dans la cavité hydrophobe de la CD (Fernandes *et al*, 2003). Cela suggère que le noyau aromatique du *trans*-anéthol se trouve dans la cavité de la CD. De plus, ces variations vers les hauts champs suggèrent la présence d'interactions hydrophobes entre le *trans*-anéthol et la cavité apolaire de la CD. Les variations des déplacements chimiques des protons H-3 et H-5 (-0,049 ppm et -0,089 ppm, respectivement) étant nettement plus importants que celles des protons H-6 (-0,033 ppm), cela permet de supposer que le *trans*-anéthol pénètre la cavité à travers la face la plus large de la CD.

Contrairement aux protons de la β -CD, tous les protons du *trans*-anéthol montrent des variations des déplacements chimiques (δ) vers les faibles champs. Cela indique sans doute un

changement dans la polarité de l'environnement du *trans*-anéthol suite à son inclusion dans la CD (Djedaini *et al*, 1990). De plus, ces variations des déplacements chimiques indiquent que les protons du *trans*-anéthol sont proches d'un atome électronégatif qui peut être l'oxygène présent dans la cavité de la CD (Garg *et al*, 2010). A la vue de ces résultats, deux possibilités peuvent être proposées: (a) la présence simultanée de deux types de complexes de stœchiométrie 1:1 issus de la pénétration du *trans*-anéthol dans la cavité de CD *via* son groupement méthoxy ou éthylène (à partir du côté large de la cavité), (b) la formation des complexes d'inclusion de stœchiométrie 2:1 (CD : *trans*-anéthol). La structure chimique du *trans*-anéthol et les résultats obtenus en HS-GC, UV-Visible ainsi que les études de phase de solubilité excluent l'hypothèse de formation d'un complexe 2:1.

Lors de l'encapsulation dans la CD, la mobilité de l'invité est réduite ce qui entraîne une diminution des temps de relaxation (T1) de ses protons. Les T1 des protons de la β -CD et du *trans*-anéthol sous forme libre ou complexée sont également reportés dans le Tableau III.11.

Nous remarquons une diminution dans les valeurs de T1 pour tous les protons du *trans*-anéthol. Cela permet d'évoquer une modification du mouvement de la molécule entière du *trans*-anéthol. Cette observation est due à la restriction de la rotation des protons du *trans*-anéthol suite à son inclusion dans la cavité de la CD (Grillo *et al*, 2007). Cependant, une diminution considérable des T1 des protons H-c ($\Delta T1 = -0.558$ s), H-d ($\Delta T1 = -0.515$ s) (du groupement éthylène) et H-f ($\Delta T1 = -0.545$ s), (du groupement méthoxy) est observée. Cela prouve que le *trans*-anéthol peut pénétrer la cavité *via* son groupement méthoxy ou éthylène. Ces résultats sont tout à fait cohérents avec ceux observés pour les déplacements chimiques (δ).

Pour le complexe β -CD/estragole, les mêmes observations sont faites pour les variations des déplacements chimiques des protons de la CD. Cela montre aussi la présence d'interactions hydrophobes entre l'estragole et la cavité de la CD suite à l'inclusion de l'estragole à partir du côté large de la cavité.

Les résultats suggèrent également la présence de deux topologies structurales des complexes d'inclusion de stœchiométrie 1:1 selon le mécanisme de pénétration dans la cavité de la CD *via* le groupement méthoxy ou vinyle, le noyau aromatique étant inclut dans la cavité de la CD. Des observations similaires ont été reportées dans la littérature indiquant l'inclusion du noyau aromatique des PPs dans la cavité des CDs (Garg *et al*, 2010 ; Yang & Song, 2005 ; Zhang *et al*, 2009a ; 2009b).

III.5.3. RMN 2D ROESY

La RMN 2D apporte des informations précieuses sur la structure des complexes d'inclusion en regardant les corrélations NOE (Nuclear Overhauser Effect). Cette technique aide à identifier les proximités spatiales des protons et détecter les interactions dipolaires inter- et intramoléculaires entre les protons de la CD et de la molécule invitée. Plus la distance entre deux protons est grande plus l'intensité de la corrélation NOE est faible. En fait, la distance ne doit pas dépasser 4 Å pour avoir une corrélation. Par conséquent, la RMN 2D permet de proposer une structure tridimensionnelle du complexe.

La carte ROESY du complexe β -CD/*trans*-anéthol est présentée dans la Figure III.15.

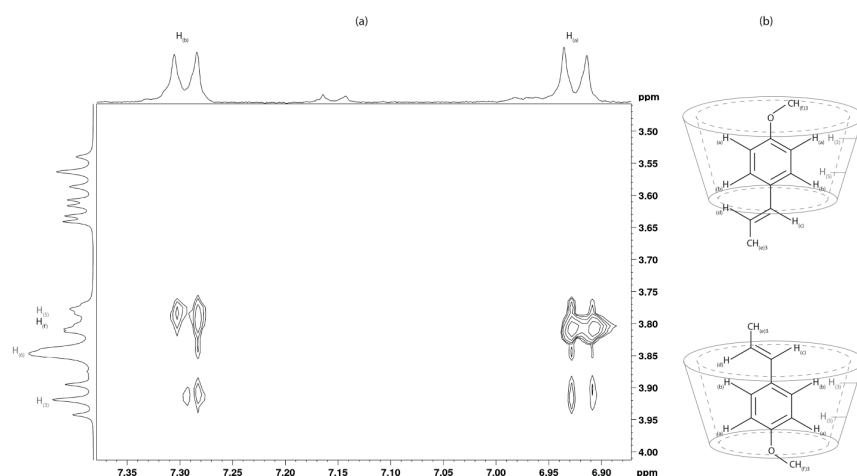


Figure III.15. a) Carte 2D ROESY du complexe β -CD/*trans*-anéthol et b) structures possibles du complexe d'inclusion.

Sur la carte ROESY nous observons que le H-f du *trans*-anéthol se trouve dans la gamme des déplacements chimiques de la CD. Une corrélation NOE montre des interactions intermoléculaires entre les protons H-a et H-f du *trans*-anéthol. De plus, cette carte démontre la présence des corrélations NOE entre les protons H-3 et H-5 de la CD et les protons H-a et H-b du noyau aromatique du *trans*-anéthol. Cela confirme que le noyau aromatique du *trans*-anéthol se trouve dans la cavité de la CD.

La présence des tâches de corrélation NOE pour les deux protons aromatiques (H-a et H-b) du *trans*-anéthol indique que le complexe existe sous deux structures géométriques selon

l'orientation du noyau aromatique à l'intérieur de la cavité. Cela est cohérent avec les observations de la ^1H RMN.

La tâche NOE entre les protons H-5 et H-b semble être plus importante que celle entre H-3 et H-b. Cela tend à prouver que le *trans*-anéthol pénètre d'une façon préférentielle dans la cavité de CD *via* son groupement éthylène. Ces observations sont bien cohérentes avec les résultats reportés par ^1H RMN.

III.6. Conclusion

Cette première partie expérimentale nous a permis de mettre en évidence la formation de complexes d'inclusion en solution entre les CDs et les sept PP étudiées. Pour ce faire nous avons utilisé plusieurs techniques chromatographiques et spectroscopiques. Trente cinq complexes d'inclusion ont été caractérisés en solution. Divers paramètres caractéristiques des complexes d'inclusion ont été déterminés : les constantes de formation (K_f), l'efficacité de complexation (CE), le rapport molaire optimal pour une meilleure encapsulation, l'augmentation du volume de la formulation contenant le complexe d'inclusion ainsi que la quantité de PP pouvant être formulée dans des dosages solides.

Les K_f des complexes de CDs avec l'estragole présent dans deux HEs, (basilic et estragon), ont été également déterminées suivant une nouvelle méthode dite "méthode rapide". Des études ^1H RMN et 2D ROESY ont permis de démontrer la réalité de l'inclusion et également d'élucider la structure tridimensionnelle des complexes d'inclusion.

Il s'avère à l'issue des résultats obtenus que les CDs possèdent une capacité importante pour la complexation et la solubilisation des PP. Nous avons remarqué que l'affinité des CDs à former un complexe d'inclusion dépendait surtout des caractéristiques physicochimiques de l'invité en question. La structure, la géométrie ainsi que la solubilité des PP sont des facteurs cruciaux qui affectent la stabilité des complexes d'inclusion obtenus mais également le pouvoir solubilisant des CDs.

Dans la suite de cette étude, nous nous sommes intéressés à la préparation de complexes à l'état solide et à la vérification des propriétés des complexes obtenus afin de mettre en œuvre de nouveaux ingrédients pour la préparation et le stockage des formulations en vue d'applications pharmaceutiques ou agroalimentaires.

Chapitre IV. Caractérisation des complexes d'inclusion solides

L'application des HEs et de leurs composants dans les domaines agroalimentaire, pharmaceutique et cosmétique est soumise à de très fortes contraintes en fonction de la température, des conditions de stockage et de la durée d'utilisation. Ces composés souffrent d'une faible solubilité et d'une volatilité élevée ainsi que d'une susceptibilité à l'oxydation ou à l'isomérisation. Ces modifications peuvent se déclencher durant l'étape de formulation ainsi que durant le stockage du produit aboutissant à une détérioration de la qualité du produit. La formulation des HEs ou de leurs composants sous forme de poudre facilite leur incorporation dans les produits pharmaceutiques, alimentaires ou cosmétiques (Bilia *et al*, 2014 ; Desai & Park 2005). Cette approche, appelée "*liquisolid*", est surtout utilisée pour améliorer la dissolution des composés ayant une faible solubilité aqueuse (JadhavAmbadas *et al*, 2013 ; Solanki *et al*, 2013). De plus, la formulation des HEs ou leurs composants sous forme de poudre apparaît comme l'une des mesures les plus efficaces pour améliorer leur stabilité. Le sucre vanillé est un exemple de la formulation d'un arôme, la vanille, sous forme de poudre.

Il existe différents systèmes d'encapsulation tels que les systèmes matriciels, membranaires et moléculaires ainsi qu'une large variété de procédés technologiques (Mali Snehal *et al*, 2013 ; Maswal & Dar, 2014 ; Munin & Edwards-Lévy, 2011).

Dans ce travail, notre choix s'est porté sur le système d'encapsulation moléculaire où les invités sont piégés dans la cavité de la CD formant ainsi les complexes d'inclusion. L'encapsulation par les CDs permet d'obtenir une poudre hydrophile soluble dans les phases aqueuses et renfermant des composés hydrophobes. Cela apporte à ces derniers une fonctionnalité de solubilisation. De plus, les complexes d'inclusion sont des produits inodores et parfaitement stables. L'encapsulation permet également la rétention des molécules aromatiques ou volatiles et par conséquent le prolongement de la date d'utilisation du produit en générant des systèmes à libération contrôlée et prolongée du produit encapsulé. Les complexes d'inclusion permettent aussi d'appliquer les invités en une plus forte concentration afin de pallier à leur dégradation ou leur disparition au cours du temps. Il a été démontré que les complexes d'inclusion solides de CDs étaient efficaces vis-à-vis des HEs (Hadaruga *et al*, 2007) ainsi que de leurs composants comme par exemple le géraniol (Menezes *et al*, 2012) et le linalol (Menezes *et al*, 2014).

Dans notre travail, les complexes d'inclusion sous forme solide ont été préparés par la méthode de lyophilisation ou « *freeze-drying* » décrite dans le paragraphe II.6.8. Cette technique est l'un des procédés les plus recommandés pour l'encapsulation des invités thermolabiles et instables en solutions aqueuses (Del Valle, 2004). La teneur en PP dans les complexes solides et l'efficacité d'encapsulation (EE%) ont été déterminées après libération des PP des CDs. Afin de vérifier s'il était possible de faire varier la teneur en PP encapsulé, différents complexes ont été préparés en modifiant le rapport molaire CD : PP dans la solution de départ. L'objectif recherché était de pouvoir charger le complexe par des doses élevées de PP. Dans une seconde partie, nous avons cherché à mettre en évidence la formation des complexes d'inclusion à l'état solide. Nous avons ainsi utilisé la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) et la calorimétrie différentielle à balayage (DSC) afin de caractériser ces complexes. Enfin, il nous a semblé important d'étudier l'effet qu'apportait la formulation sous forme de complexes solides sur la libération et la stabilisation des PPs.

IV.1. Préparation des complexes CD/PP à l'état solide

Dans un volume d'eau précis, les CDs et les PPs sont mélangés suivant différents rapports molaires CD:PP (1:1, 3:1 et 6:1). Les solutions sont ensuite soumises à une agitation de 150 rpm, à 25 °C pendant 24 h suivies d'une filtration (0,45 µm). Les filtrats sont congelés et lyophilisés (-85 °C, 1 Pa) à l'aide d'un Christ Alpha 2-4 LD Freeze dryer pendant 48 h ou jusqu'à l'élimination entière de l'eau. La poudre récupérée est considérée comme le complexe d'inclusion solide.

IV.2. Préparation des mélanges physiques CD/PP

Les mélanges physiques sont préparés en mélangeant à l'aide d'une spatule les quantités correspondantes de CDs et PPs.

IV.3. Détermination de la teneur en PP et de l'efficacité d'encapsulation

Dans un premier temps, il est nécessaire de déterminer la quantité d'invité encapsulé dans le complexe d'inclusion. Deux paramètres sont ainsi évalués *a)* la teneur en PP dans les complexes lyophilisés (exprimée en mg de PP/g de complexe d'inclusion) déterminée selon l'équation IV.1

et *b*) l'efficacité d'encapsulation de PP (exprimée en pourcentage, EE%) calculée selon la relation IV.2.

$$\text{Teneur en PP} = \frac{\text{PP}_{\text{exp}} \text{ (mg)}}{\text{masse du complexe d'inclusion (g)}} \quad \text{IV.1}$$

$$\text{EE \%} = \frac{\text{PP}_{\text{exp}} \text{ (mg)}}{\text{PP}_t \text{ (mg)}} \times 100 \quad \text{IV.2}$$

Avec PP_{exp} : la quantité de PP dosée expérimentalement ; PP_t : la quantité de PP théorique (ajoutée dans le milieu réactionnel durant la préparation du complexe d'inclusion).

La détermination de la teneur en PP dans les complexes d'inclusion solide et l'EE% est effectuée par spectroscopie UV-Visible et par extraction multiple par espace de tête (MHE).

IV.3.1. UV-Visible

Afin de quantifier la teneur en PP dans les complexes d'inclusion solides et de calculer par la suite l'efficacité d'encapsulation (EE%), il est nécessaire de dissoudre le complexe dans un solvant organique. Cette étape permet de s'affranchir des phénomènes de complexation et donc de libérer l'invité de la cavité de la CD. De plus, contrairement aux milieux aqueux, la CD n'interfère pas avec l'absorbance de l'invité dans un solvant organique. Dix mg de complexe d'inclusion solide sont ainsi pesés et dissouts dans 10 mL d'éthanol. Le mélange est agité pour permettre une bonne dissolution et une libération de l'invité de la cavité de la CD. La quantité d'invité dans les solutions obtenues est déterminée par dosage par spectroscopie UV-Visible selon les conditions expérimentales décrites dans le paragraphe III.4.1.

Trois lots de chacun des complexes sont préparés indépendamment et pour chaque lot le dosage est réalisé sur trois pesées différentes afin de vérifier l'homogénéité du lot. Les complexes d'inclusion solides sont ensuite conservés à 4 °C pour des études ultérieures.

IV.3.2. Extraction multiple par espace de tête

La teneur en PP dans les complexes d'inclusion ainsi que l'efficacité d'encapsulation (EE%) sont déterminées en *headspace* par le mode d'extraction multiple (*multiple headspace extraction*,

MHE) en utilisant un étalon externe selon la méthode décrite par Kolb & Ettre (2006). La MHE consiste en une série de cycles d'échantillonnage de la phase gazeuse contenant le produit volatil (voir paragraphe II.8.4) alors que dans l'headspace en mode statique, utilisé précédemment (chapitre III), une seule extraction est réalisée. A chaque échantillonnage la phase gazeuse est envoyée à travers la ligne de transfert pour l'analyse chromatographique.

La présence de l'eau est essentielle pour la dissociation du complexe solide. Dix mg du complexe sont ainsi dissouts dans 10 mL d'eau et placés dans des vials de 22 mL. Ensuite une série d'extractions successives de la phase gazeuse est réalisée à 60 °C. Avec chaque extraction successive, la quantité de produit volatil présente dans la phase gazeuse, et donc l'aire de son pic chromatographique, sera de plus en plus faible bien que le coefficient de partage reste inchangé. La somme des aires obtenues pour l'ensemble des extractions sera donc égale à la quantité de composé présent dans l'échantillon de départ (et donc dans le complexe d'inclusion). Pour une calibration externe de l'analyse, une série de MHE est effectuée dans les mêmes conditions sur une quantité précise et connue (0,1 mg) du composé volatil seul. Cette méthode est uniquement applicable aux PP volatils. La quantité de PP est calculée par régression linéaire en traçant la droite (l'équation IV.3) pour l'échantillon et le standard :

$$\text{Ln}A_i = -q(i-1) + \text{Ln}A_1 \quad \text{IV.3}$$

Avec A_1 : l'aire du pic chromatographique à la première extraction correspondant à l'ordonnée à l'origine de la droite ; A_i : l'aire du pic chromatographique à l'étape i de la série de MHE ; q : la pente de la droite $\text{Ln}A_i$ en fonction de $(i-1)$. La valeur du quotient Q est calculée à partir de la pente selon l'équation suivante :

$$Q = e^{-q} \quad \text{IV.4}$$

La somme des aires correspondant à la quantité totale de PP présente dans l'échantillon de départ ou dans le standard est calculée à partir de la relation suivante :

$$\sum A_i = \frac{A_1}{1-Q} \quad \text{IV.5}$$

En comparant la somme des aires de l'échantillon à celle du standard nous pouvons calculer la quantité de PP présente dans le complexe d'inclusion par l'équation suivante :

$$PP_{\text{exp}}(\text{mg}) = \frac{\sum A_{\text{ic}}}{\sum A_{\text{is}}} \times 0.1 \quad \text{IV.6}$$

Avec $\sum A_{\text{ic}}$ et $\sum A_{\text{is}}$: les sommes des aires du pic chromatographique de l'échantillon contenant le complexe et le standard, respectivement.

La teneur en PP et l'EE% sont ensuite calculées selon les équations IV.1 et IV.2, respectivement.

IV.3.3. Résultats et discussion

IV.3.3.1. Spectroscopie UV-Visible

La teneur en PP dans les complexes d'inclusion ainsi que EE% sont déterminées par spectroscopie UV-Visible. Ces résultats sont obtenus en partant d'un rapport équimolaire CD:PP. L'effet de la variation du rapport molaire de départ est également démontré.

IV.3.3.1.1. Effet du rapport équimolaire

Les teneurs en PP et les EE% obtenus par spectroscopie UV-visible pour les complexes préparés selon un rapport molaire 1:1 sont calculées suivant les équations IV.1 et IV.2 et regroupés dans les Tableau IV.1 et IV.2, respectivement.

Tableau IV.1. Teneur en PP dans les complexes (mg PP/g du complexe d'inclusion).

	<i>trans</i> - anéthol	estragole	eugénol	isoeugénol	acide caféique	acide <i>p</i> - coumarique	acide férulique
α -CD	33	23	120	97	94	110	122
β -CD	19	25	120	86	87	80	89
HP- β -CD	22	37	98	61	96	76	92
RAMEB	33	41	109	72	108	89	115
CRYSMEB	29	42	116	90	96	96	116

Tableau IV.2. Efficacité d'encapsulation (EE%).

	<i>trans</i> - anéthol	estragole	eugénol	isoeugénol	acide caféique	acide <i>p</i> - coumarique	acide férulique
α -CD	25	14	82	57	61	83	73
β -CD	17	21	94	64	63	69	60
HP- β -CD	24	40	99	55	89	84	80
RAMEB	33	40	99	73	90	88	90
CRYSMEB	26	38	96	53	74	86	83

Comme nous pouvons le constater, l'eugénol, l'isoeugénol, l'acide caféique, l'acide *p*-coumarique et l'acide férulique atteignent une teneur entre 61 et 122 mg de PP/g de complexe d'inclusion avec une EE% entre 53 et 99% (Tableaux IV.1 et IV.2). Nos résultats sont tout à fait cohérents avec les données de la littérature (Seo *et al*, 2010).

Il est à noter que la teneur de ces cinq PPs dans les complexes de β -CD est entre 80 et 120 mg de PP/g de complexe. Cela tombe bien dans l'intervalle théorique, de 8 et 12%, pour la teneur en HEs dans les complexes de β -CD (Pagington, 1987). Cela nous permet de conclure que la préparation selon un rapport molaire 1 :1 est convenable pour l'encapsulation de ces PPs.

Concernant le *trans*-anéthol et l'estragole, nous remarquons que la teneur en PP et les valeurs de EE% sont plus faibles et varient entre 19 et 42 mg PP/g de complexe et entre 17 et 40 %, respectivement. Cette observation peut être due à la très faible solubilité aqueuse de ces deux molécules, 22 et 48 mg/L pour le *trans*-anéthol et l'estragole, respectivement (calculées à partir les études de phase de solubilité). Par conséquent, seule une très faible proportion de ces composés est disponible en solution et peut être incluse dans la cavité de CD.

Une relation linéaire est observée entre les valeurs d'EE% et K_f calculées uniquement dans le cas du *trans*-anéthol et de l'estragole (Figure IV.1). Les valeurs de K_f illustrées dans cette figure sont celles déterminées en UV-Visble.

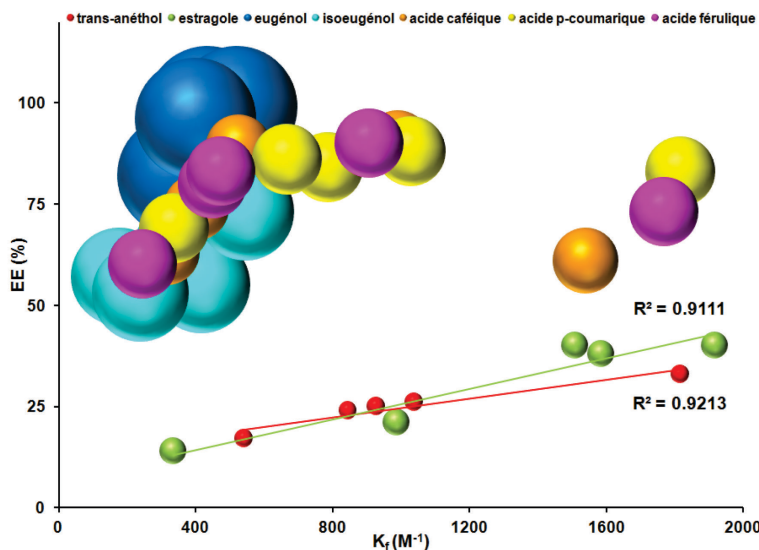


Figure IV.1. Représentation graphique montrant une corrélation entre EE% et K_f des complexes d'inclusion des PP. (L'augmentation de la taille des boules indique une solubilité aqueuse plus importante du PP).

Ces résultats mettent en évidence que la nature de l'invité a un effet prédominant sur sa complexation et sa solubilisation. De plus, cela montre que la stabilité du complexe joue un rôle important dans la dissolution des invités pratiquement insolubles où une discrimination par les différentes CDs est observée. Nous pouvons conclure que la préparation des complexes par lyophilisation est un procédé efficace pour l'encapsulation des PPs. De plus, l'efficacité d'encapsulation de 94 à 99%, obtenue pour certains complexes (Tableau IV.2), indique que les pertes sont négligeables durant le processus de lyophilisation. Ces résultats montrent le potentiel de la technique pour le développement de formulations hydrophiles à partir de molécules actives hydrophobes pouvant être utilisées les domaines pharmaceutique, agroalimentaire ou autres.

IV.3.3.1.2. Influence des différents rapports molaires

Suite aux résultats précédents, nous avons jugé important d'évaluer l'influence du rapport molaire CD:PP sur la teneur en PP du complexe et sur l'EE%.

Pour ce faire, deux PPs ont été choisis, le *trans*-anéthol et l'estragole, car ils présentent les plus faibles teneurs en PP ainsi que les plus faibles valeurs d'EE%. Des complexes d'inclusion CD/*trans*-anéthol et CD/estragole ont été préparés selon différents rapports molaires 1:1, 3:1 et 6:1.

Les valeurs d'EE% et de teneur en *trans*-anéthol ou estragole ont été calculées suivant les équations IV.1 et IV.2 (Figure IV.2). Les valeurs d'EE% sont montrées dans la Figure IV. 2 pour a) le *trans*-anéthol et b) l'estragele ainsi que les teneurs en c) *trans*-anéthol et d) estragole dans les complexes solides préparés à des différents rapports molaires CD:PP.

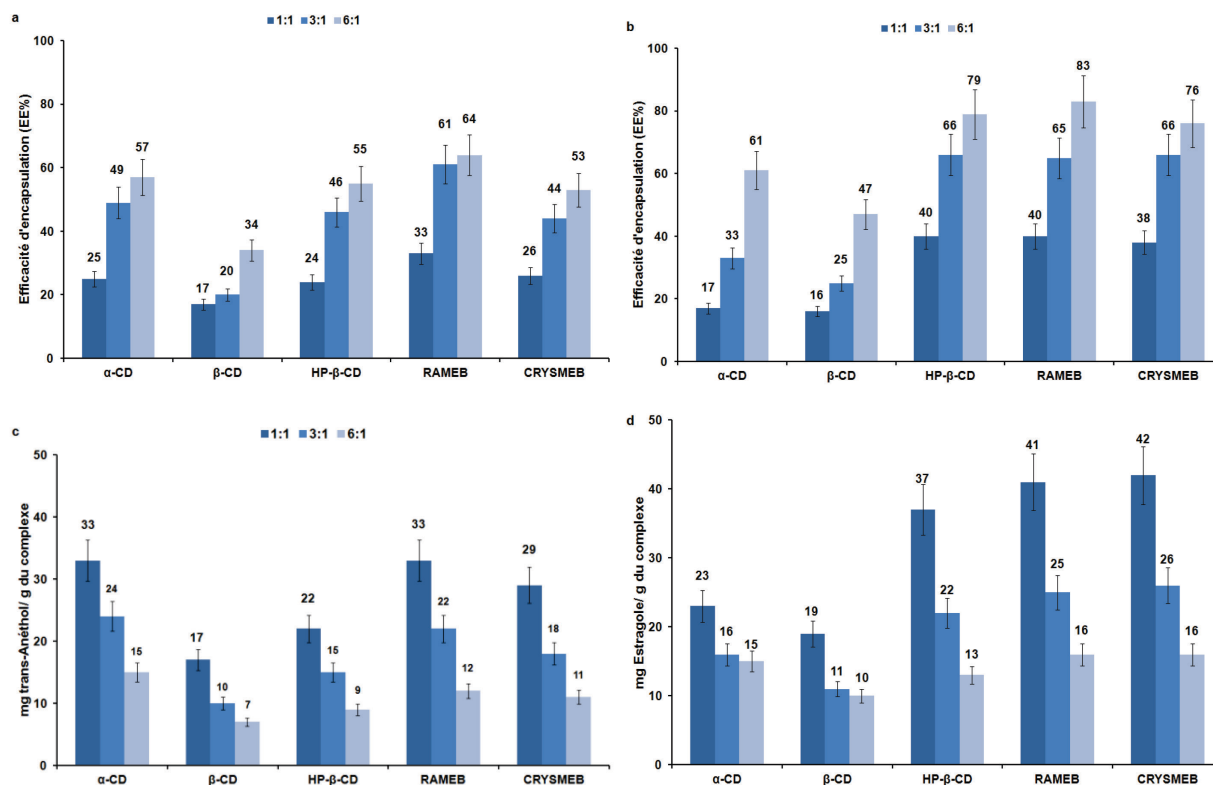


Figure IV.2. Histogrammes montrant les valeurs d'EE% des complexes de CDs avec a) le *trans*-anéthol et b) l'estragele et la teneur en c) *trans*-anéthol et d) estragole dans les complexes solides préparés à des différents rapports molaires CD:PP.

Dans le cas de ces deux phénylpropènes, une nette augmentation d'EE% est observée avec l'augmentation de la quantité de CD dans le milieu réactionnel de départ (Figure IV.2 a et b). Quelque soit le rapport molaire, nous remarquons que les dérivés de la β -CD montrent les meilleures EE% par rapport à la CD native. Ces observations sont cohérentes avec les résultats rapportés dans la littérature (Dos Santos *et al*, 2012; Fernandes *et al*, 2009; Wang *et al*, 2014).

L'augmentation de l'EE% n'est pas linéaire avec le rapport molaire, voire la quantité de CD initiale. Le rapport 6:1 (CD:PP) permet l'encapsulation avec une EE% allant de 34 à 64 % pour le *trans*-anéthol (Figure IV.2 a) et de 47 à 83 % pour l'estragele (Figure IV.2 b). Cependant, une

encapsulation totale de l'invité n'est pas atteinte, même dans le cas où les rapports molaires sont plus importants que ceux estimés par l'étude de phase de solubilité. Ceci démontre qu'il est difficile d'estimer précisément le rapport optimal pour atteindre l'encapsulation totale du composé. Il faut signaler à ce propos que cela peut être aussi dû à des pertes durant le processus expérimental. En fait, en solution nous avons toujours un équilibre entre les gouttelettes insolubles dispersées sur la surface et la forme encapsulée ou dissoute de l'invité.

Nous avons également étudié l'effet du rapport molaire sur la teneur finale en *trans*-anéthol et estragole dans les complexes d'inclusion. Il est intéressant de noter que la teneur en PP diminue avec l'augmentation de l'EE% sur toute la plage de proportion en CD étudiée. La teneur en *trans*-anéthol et estragole dans leurs complexes d'inclusion sont de 17-33 à 7-15 mg de *trans*-anéthol/g de complexe et de 19-42 à 10-16 mg d'estrageole/g de complexe en passant du rapport 1:1 au rapport 6:1 (CD:PP). Dans ce cas, des quantités importantes de complexes d'inclusion doivent être utilisées pour atteindre la concentration voulue en produit encapsulé.

Compte tenu de cet inconvénient ainsi que des considérations toxicologiques et économiques, principalement dans le domaine pharmaceutique, il est préférable d'éviter l'utilisation de quantités élevées de CDs tout en incorporant une quantité juste suffisante pour l'encapsulation de l'invité (Loftsson *et al*, 2005; Rao & Stella, 2003). Par conséquent, la préparation des complexes d'inclusion en partant d'un rapport équimolaire semble être le meilleur choix pour l'encapsulation des PPs. Seuls les complexes d'inclusion préparés selon le rapport molaire 1:1 seront alors caractérisés dans la suite de ce travail.

Ces résultats montrent donc que nous pouvons, en modifiant la concentration des espèces dans le milieu de préparation, moduler les quantités encapsulées d'invité et donc l'EE%. Toutefois, il est nécessaire de préparer des complexes avec une teneur en PP satisfaisante et une quantité tolérée en CD.

IV.3.3.2. Extraction multiple par espace de tête (MHE)

Les teneurs en PP volatils et l'EE% ont été également déterminées en MHE. Cette méthode est mise au point et appliquée pour la première fois dans notre travail pour le *trans*-anéthol et l'estrageole. Les résultats obtenus sont identiques à ceux déterminés par spectroscopie UV-Visible. La Figure IV.3 montre un exemple de séries de MHE pour le *trans*-anéthol dans ses complexes avec l'HP- β -CD préparés selon les rapports molaires 1:1 et 6:1 (CD: *trans*-anéthol).

En comparant les aires des pics chromatographiques correspondant au *trans*-anéthol nous pouvons constater la diminution de la teneur en PP encapsulé en passant du rapport molaire 1:1 au rapport 6:1 (Figure IV.3).

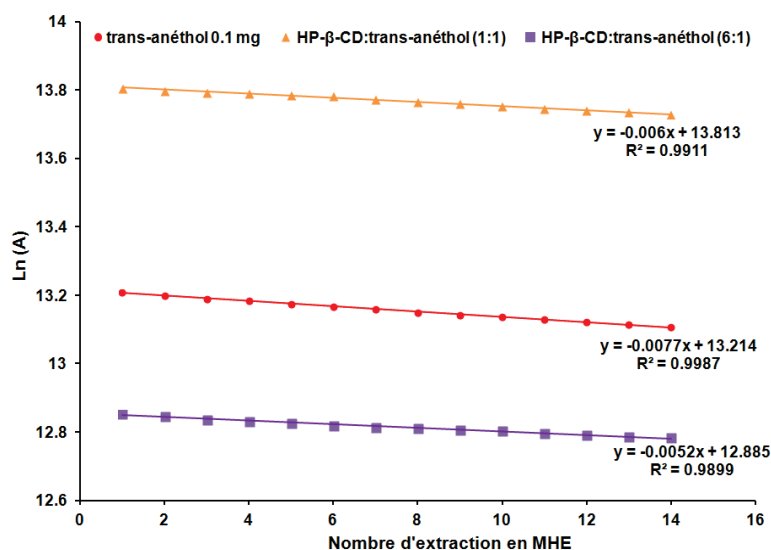


Figure IV.3. Graphique montrant la diminution des aires du pic chromatographique du *trans*-anéthol dans les complexes HP-β-CD/ *trans*-anéthol (préparés selon les rapports molaires 1:1 et 6:1) avec l'augmentation du nombre d'extractions successives.

Une aire de pic plus élevée indique la présence d'une quantité plus importante d'invité dans l'échantillon. Les droites présentées dans la Figure IV.3 nous permettent également de calculer la teneur en *trans*-anéthol dans le complexe d'inclusion. La procédure de calcul se base sur une calibration externe (MHE de 0,1 mg du *trans*-anéthol) à laquelle seront comparées les sommes des aires du pic chromatographique du *trans*-anéthol obtenues suite aux différentes étapes de la MHE. Cela nous permet de remonter à la teneur de *trans*-anéthol dans le complexe d'inclusion.

Le Tableau IV.3 montre un exemple de calcul de la teneur en *trans*-anéthol dans les complexes d'inclusion HP-β-CD/ *trans*-anéthol préparés selon les rapports molaires 1:1 et 6:1 (Figure IV.3) ; les valeurs calculées sont comparées avec celles obtenues par spectroscopie UV-Visible.

	Pente	Q	1-Q	Y	Ai	ΣA_i	mg AN	mg AN/ g complexe	EE%
AN 0.1 mg	-0.0077	0.9923	0.0077	13.214	547983	7.89E+07	0.100		
HP- β -CD:AN (1:1)	-0.0060	0.9940	0.0060	13.813	997493	1.67E+08	0.211	21.1(22*)	23.3 (24*)
HP- β -CD:AN (6:1)	-0.0052	0.9948	0.0052	12.885	394352	7.60E+07	0.096	9.6 (9*)	58.7 (55*)

*Valeurs obtenues en spectroscopie UV-Visible

Tableau IV.3. Exemple de calcul de la teneur en *trans*-anéthol (AN) et de l'EE% dans les complexes d'inclusion avec l'HP- β -CD (préparés selon les rapports molaires 1:1 et 6:1) comparées au standard (AN 0,1 mg) (équations IV.4, IV.5 et IV.6).

Les valeurs calculées dans le Tableau IV.3 comme pour les autres complexes d'inclusion sont tout à fait cohérentes avec celles obtenues en spectroscopie UV-Visible (Tableau IV.2).

Ces résultats montrent l'avantage de la MHE pour le dosage et la quantification des composés volatils dans des conditions douces de manipulation et sans l'utilisation de solvant organique.

IV.4. Etude par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)

IV.4.1. Méthodologie

La formation des complexes d'inclusion est vérifiée par FTIR dans un intervalle de fréquence entre 4000 et 400 cm^{-1} . Les spectres infrarouge des complexes sont analysés et comparés aux spectres des espèces libres. Les échantillons sont préparés en mélange avec du KBr. Ce mélange est ensuite soumis à une pression allant de 5 à 15 tonnes/ cm^2 pour former la pastille. Les spectres sont enregistrés par un spectrophotomètre « FT/IR-6300 JASCO ».

IV.4.2. Résultats et discussion

Les spectres FTIR des PPs, des CDs et de leurs complexes d'inclusion sont montrés dans la Figure IV.4. Dans le cas des sept PPs utilisés, nous n'avons pas observé de variation significative des bandes caractéristiques des CDs ni d'apparition de nouvelle bande. Cela indique l'absence d'interactions covalentes entre les PPs encapsulés et les groupes C-C, C-O-C et O-H de la molécule hôte (Wang *et al*, 2011). Toutefois, la fréquence de la bande de valence O-H lié de la β -CD et de l'HP- β -CD, observées respectivement à 3412 et 3430 cm^{-1} , subit un déplacement vers les faibles nombres d'onde. Cela indique la libération des molécules d'eau de la cavité de la CD et la réorganisation des groupements hydroxyles ainsi que la formation de liaisons hydrogènes entre les constituants du complexe (Ayala-Zavala *et al*, 2008 ; Wang *et al*, 2011).

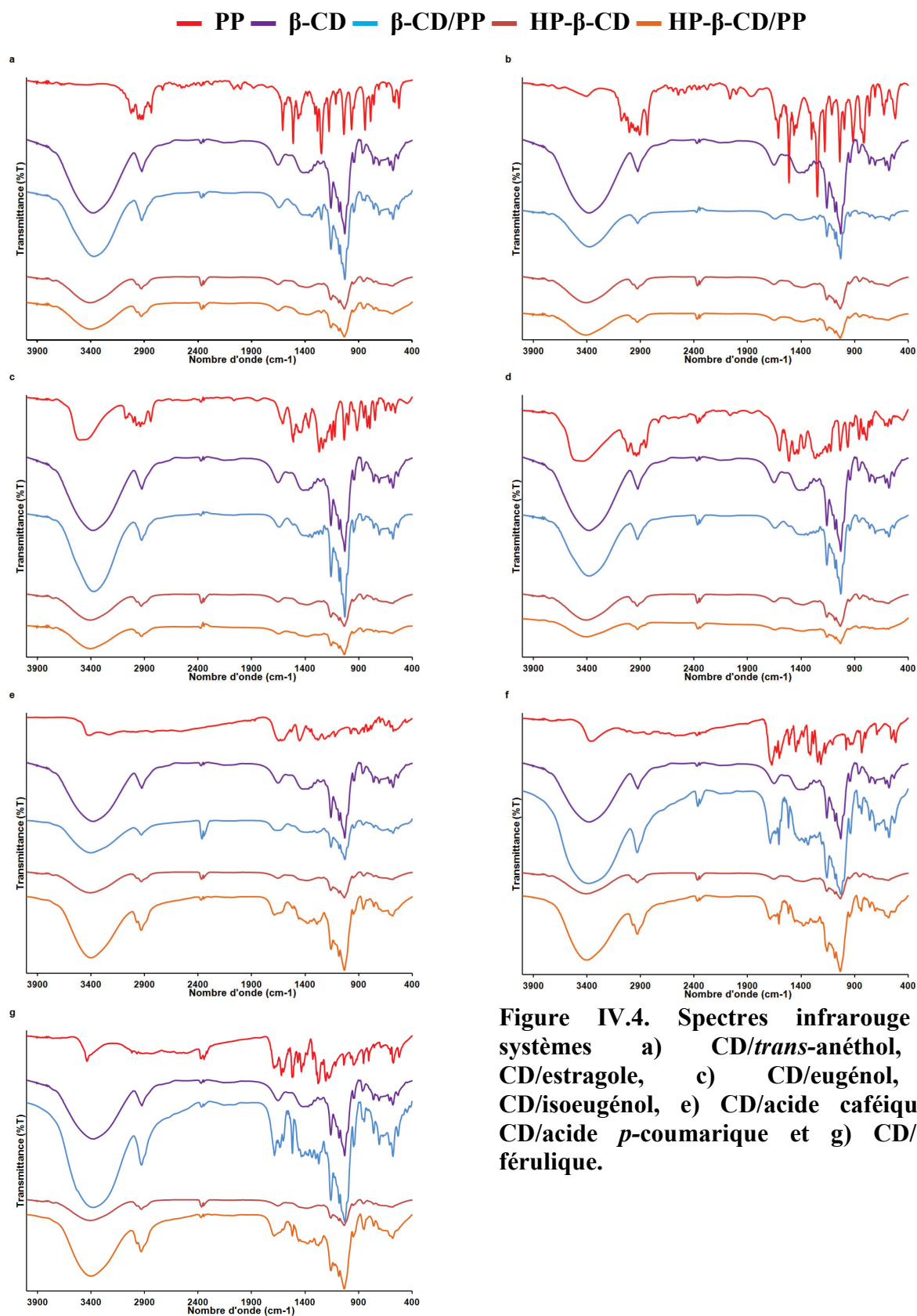


Figure IV.4. Spectres infrarouge des systèmes a) CD/*trans*-anéthol, b) CD/estragole, c) CD/eugénol, d) CD/isoeugénol, e) CD/acide caféique, f) CD/acide *p*-coumarique et g) CD/acide férulique.

Nous remarquons que quelques bandes caractéristiques de chaque PP sont reproduites dans les spectres FTIR des complexes d'inclusion correspondants. Les bandes spécifiques de chaque PP qui apparaissent dans les spectres de ses complexes d'inclusion sont données dans l'Annexe n°1. Cependant, ces bandes caractéristiques présentent une faible intensité dans les spectres des complexes d'inclusion correspondant. Ceci peut être dû à la restriction du PP dans la cavité de CD ainsi qu'au fait que le PP ne représente pas plus de 10 à 15% de la masse du complexe d'inclusion (Yang & Song, 2005).

La disparition ainsi que la modification de l'intensité ou le déplacement des bandes caractéristiques des PP indiquent que ces derniers sont bien inclus à l'intérieur de la cavité de la CD dans les complexes solides.

IV.5. Etude par calorimétrie différentielle à balayage (DSC)

IV.5.1. Méthodologie

La DSC est utilisée pour vérifier l'inclusion des invités à l'intérieur de la CD en comparant les thermogrammes des complexes d'inclusion à ceux des espèces libres et de leurs mélanges physiques. Les thermogrammes ont été enregistrés à l'aide d'un appareil « Mettler-Toledo DSC821 differential calorimeter ». L'indium est utilisé pour la calibration. Les échantillons (CDs, invités et complexes d'inclusion) sont pesés (3-5 mg) et placés dans un creuset percé en aluminium sous flux d'azote (flux de 40 ml/ min). L'analyse balaie une gamme de température entre 50 et 250 °C avec une vitesse de 10 °C/min. L'analyse de chaque échantillon est reproduite en triplicate.

IV.5.2. Résultats et discussion

L'analyse thermique différentielle est utilisée pour observer les changements de propriétés et des événements thermiques de l'invité suite à la formation de complexes d'inclusion. Le thermogramme d'une molécule en calorimétrie différentielle présente des points caractéristiques en fonction de la température. Quand une molécule hôte et un invité s'associent pour former un complexe d'inclusion, nous pouvons observer un déplacement ou une disparition des pics caractéristiques de la molécule invitée. Le comportement thermique du complexe est étudié et comparé à celui des espèces libres et de leur mélange physique. Le but de cette analyse consiste à

obtenir une preuve de l'existence du complexe d'inclusion par l'observation de différences entre ce complexe et un simple mélange physique.

L'ensemble des transitions de phase de la molécule invitée avant le début de la dégradation thermique et l'oxydation des CDs peut ainsi être détecté par cette technique.

Nous avons choisi de réaliser l'analyse jusqu'à 250 °C parce que la dégradation thermique accompagnée de l'oxydation de la β -CD, commence aux alentours de 250 °C à l'état solide et continu jusqu'à 300 °C à l'état liquide (Giordano *et al*, 2001).

Les thermogrammes obtenus sont illustrés dans la Figure IV.5. Aucune information quantitative ne peut être tirée de ces spectres.

Les thermogrammes des PP libres montrent des pics caractéristiques indiquant les températures caractéristiques d'évaporation ou de fusion de ces composés. Les températures d'évaporation du *trans*-anéthol et de l'estragole sont de 236 et 220 °C, respectivement alors que les températures de fusion de l'acide caféique, de l'acide *p*-coumarique et de l'acide férulique sont de 229, 218 et 174 °C, respectivement.

Les spectres obtenus pour les complexes d'inclusion montrent une disparition ou une diminution du pic correspondant au PP seul. Pour l'ensemble des composés étudiés, le profil thermique du mélange physique est différent de celui du complexe d'inclusion correspondant. Nous remarquons que ces profils comportent une superposition des pics caractéristiques de l'invité et de la CD. Cela confirme qu'un simple mélange physique n'est pas suffisant pour induire l'encapsulation de l'invité à l'intérieur de la cavité de la CD.

Ces résultats sont en accord avec ceux de la littérature où les auteurs confirment par exemple l'inclusion de l' α -pinène, du linalol, du thymol, du géraniol et du *p*-cymène dans les CDs à l'aide de l'analyse des thermogrammes (Kfoury *et al*, 2014 ; Mourtzinos *et al*, 2008 ; Serafini *et al*, 2012). La littérature est également riche en exemples sur la caractérisation des complexes d'inclusion des CDs avec les HEs (Hadaruga *et al*, 2007; Suta *et al*, 2013).

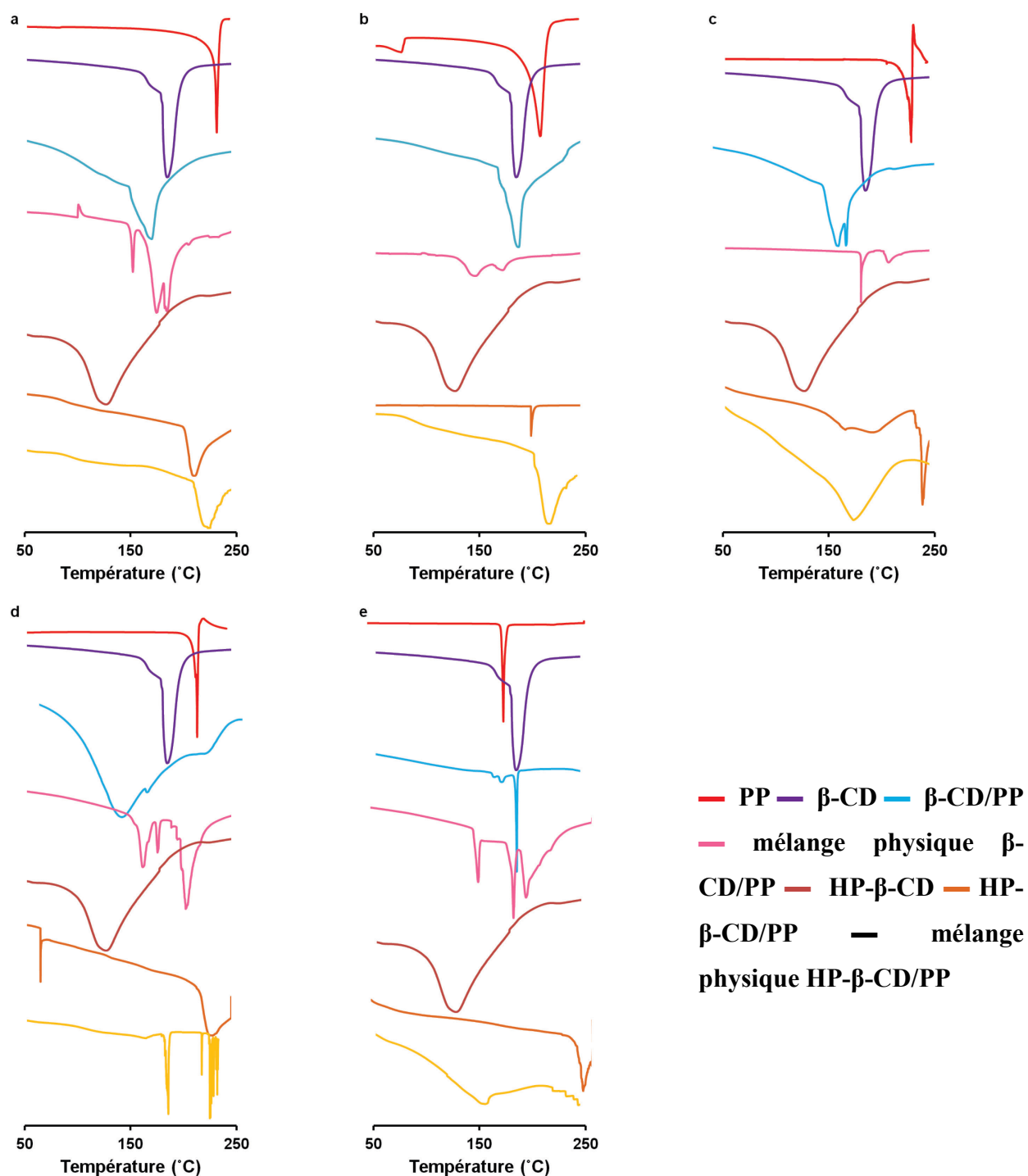


Figure IV.5. Thermogrammes DSC des systèmes a) CD/*trans*-anéthol, b) CD/estragole, c) CD/acide caféique, d) CD/acide *p*-coumarique et e) CD/acide férulique.

IV.6. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons préparé les complexes d'inclusion des CDs avec les PPs par la méthode de lyophilisation. Nous avons déterminé la quantité d'invité complexé en termes de teneur en PP dans le complexe d'inclusion et d'EE% par spectroscopie UV-Visible et également en mettant au point une nouvelle méthode d'extraction multiple par espace de tête (MHE). Nous avons aussi mis en évidence l'effet de la concentration en espèces libres dans le milieu réactionnel sur la teneur en invité dans les complexes d'inclusion solides et les valeurs d'EE%. L'influence du rapport molaire utilisé lors de la préparation sur ces deux paramètres ne semble pas être identique. Dans ce chapitre, nous avons également mis en évidence par les techniques de caractérisation usuelles (FTIR, DSC) la formation des complexes d'inclusion à l'état solide.

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à conforter nos observations expérimentales par une étude théorique de caractérisation structurale des complexes d'inclusion, la modélisation moléculaire. Dans le chapitre suivant, une étude de modélisation moléculaire sera présentée pour visualiser la complémentarité stérique entre les CDs et les PPs et comprendre les mécanismes régissant le phénomène d'inclusion.

Chapitre V. Modélisation moléculaire

Dans le but de visualiser la structure tridimensionnelle des complexes d'inclusion et de mieux comprendre le mécanisme de complexation, nous avons effectué une étude théorique de modélisation moléculaire des complexes obtenus entre la β -CD et les PPs. La modélisation moléculaire consiste à prévoir la structure et la réactivité des molécules ou des systèmes de molécules.

Dans notre étude, la modélisation repose principalement sur l'observation de la complémentarité stérique entre la CD et les invités, par la recherche des minima d'énergie correspondant aux conformères stables.

V.1. Méthodologie

La modélisation moléculaire des complexes d'inclusion entre la β -CD et les PPs étudiés a été réalisée en utilisant la méthode de Monte Carlo associée à la mécanique moléculaire. La mécanique moléculaire calcule l'énergie des atomes (et non pas des électrons) au moyen d'approximations semi-classiques. Cela résulte en une simplification considérable des calculs et permet de travailler sur des grandes molécules ou sur des systèmes comportant plusieurs molécules comme les complexes d'inclusion. Il faut noter que les méthodes de modélisation moléculaire par mécanique moléculaire, mécanique quantique et/ou dynamique moléculaire peuvent être utilisées pour évaluer l'énergie d'interaction entre les composantes du complexe d'inclusion et définir sa géométrie (Marconi & Mayer, 1997). Des méthodes couplant plusieurs approches comme par exemple la mécanique quantique à la mécanique moléculaire appelées méthodes hybrides ont été récemment développées (Bryce & Hillier, 2014 ; Xu & Lill 2013).

Dans le cas des complexes avec les CDs, l'approche utilisée étudie le comportement des invités durant la formation des complexes d'inclusion suivant le système de coordonnées XYZ (Eid *et al*, 2011 ; Shi & Ye, 2010). La méthode Monte Carlo est une méthode exhaustive qui sert à échantillonner d'une façon aléatoire la surface de potentiel définie par le complexe étudié en effectuant des translations et rotations aléatoires de l'invité selon les trois axes XYZ (Alcaro *et al*, 2003 ; Alcaro *et al*, 2004 ; Kim *et al*, 2002). Lors de l'application de cette stratégie de "docking" la structure de la β -CD est figée avec les sept oxygènes glucosidiques dans le plan

XY, et l'axe Z passant par le centre de la β -CD. L'invité peut se trouver dans deux positions : soit orientée vers la partie positive de l'axe Z, soit vers la partie négative. Cela dépend du groupement fonctionnel qui pénètre la β -CD à travers le côté large de la CD. Généralement, les invités pénètrent la cavité de la CD à travers le côté large du cône où le gêne stérique est inférieur à celui du côté étroit (Castro & Barbiric, 2002).

Durant ces études de simulation, la structure de la β -CD est maintenue symétrique et fixe à l'aide de l'option Freeze Atoms du menu Substructure. La structure de la β -CD est gardée fixe car notre but consiste à visualiser et interpréter la capacité d'inclusion de la CD vis-à-vis de différents invités, et non pas sur son comportement interne. De plus, le temps nécessaire pour effectuer une simulation exhaustive de la β -CD libre serait trop important, étant donné le très grand nombre de degrés de liberté de cette structure. L'optimisation d'une CD non maintenue rigide conduirait de plus à des minima locaux et non au minimum global. Cela rend impossible la comparaison des conformations de complexation, puisque la CD se trouve dans des états énergétiques différents, sans avoir été échantillonnée d'une manière exhaustive.

Lors la recherche, si l'invité s'éloigne beaucoup de la cavité, la conformation obtenue est moins stable. L'invité reprend par la suite une des conformations les plus stables, et poursuit son déplacement vers l'autre direction (Choi *et al*, 2000). Le logiciel supprime automatiquement toutes les conformations dupliquées et celles qui dépassent la limite énergétique imposée. La recherche se fait dans des conditions précises fixées au départ : température constante, milieu gazeux ou en présence de solvant, les deux milieux étant caractérisés par une constante diélectrique spécifique. La distance maximale entre deux conformations considérées comme identiques est également imposée au départ. Durant la recherche, la molécule invitée peut se trouver dans différentes conformations. Le nombre de déformations réalisées dépend de la flexibilité du système moléculaire.

Dans notre travail, nous avons utilisé le logiciel Schrödinger, avec l'interface graphique Maestro 9.6.Ink, et le module Macromodel de la mécanique moléculaire. Le logiciel utilisé permet d'optimiser les conformations structurales, d'imposer un traitement implicite de la solvation, ainsi que d'accomplir des recherches conformationnelles et des simulations de dynamique moléculaire. Une variété de champs de force est intégrée dans ce logiciel, parmi lesquels nous pouvons citer les champs de force natifs : OPLS_2001 (*Optimized Potential for Liquid Simulations*), OPLS_2005, MMFF (*Merck Molecular Force Field*), MMFFs, AMBER94

(*Assisted Model Building and Energy Refinement*) et les champs dérivés à partir des champs de force natifs : MM2* (Mécanique Moléculaire), MM3*, AMBER* et OPLS* (Kimura *et al*, 2007 ; Lino *et al*, 2002 ; Pinto *et al*, 2004).

Avant de procéder à la simulation des complexes, une étape préliminaire consiste à construire les sept PPs que nous voulons étudier : *trans*-anéthol, estragole, eugénol, isoeugénol, acide caféique, acide *p*-coumarique et acide férulique. Ensuite, et avant de les placer à l'intérieur de la cavité de CD, ces invités sont soumis à une recherche conformationnelle dans les conditions suivantes:

- Champ de force : MM3*
- Milieu aqueux avec une constante diélectrique de 78.0 (modèle implicite GB/SA)
- Méthode de minimisation : (FMNR conjugate gradient minimization, convergence fixée à 0,05 kJ Å⁻¹ mol⁻¹) avec un maximum d'itérations de 100
- Méthode d'échantillonnage : Mixed torsional/Low mode sampling
- 1000 conformations générées.

Cela nous permet de trouver la conformation la plus stable de chacun. Cette conformation sera retenue pour la formation du complexe d'inclusion avec la β -CD.

La structure minimisée de l'invité est tout d'abord placée manuellement à l'intérieur d'une structure symétrique de β -CD selon 2 modes d'inclusion E1 et E2 (Figure V.1) (E1 et E2 font référence à la pénétration de la cavité de la CD *via* la chaîne propényle ou allyle de l'invité ou bien *via* les autres substituants du noyau aromatique de l'invité, respectivement).

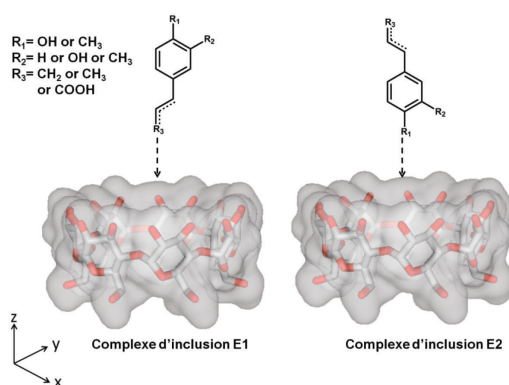


Figure V.1. Stratégie d'inclusion

Les complexes obtenus sont ensuite optimisés à l'aide d'une recherche conformationnelle à partir de la méthode de Monte Carlo dans les conditions suivantes:

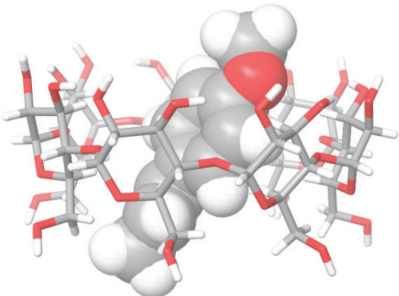
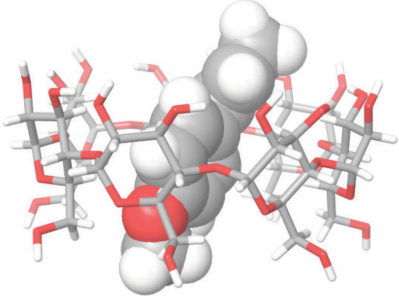
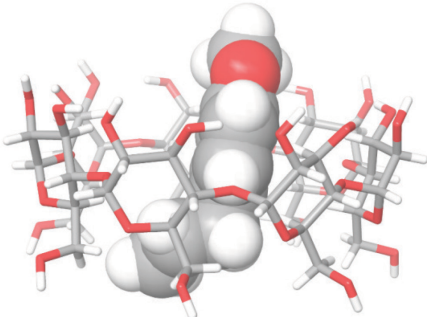
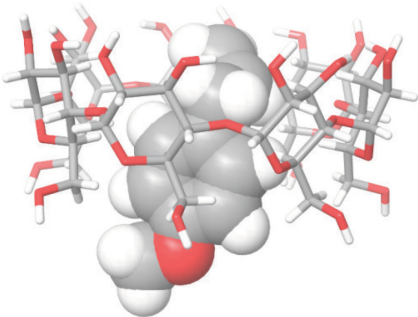
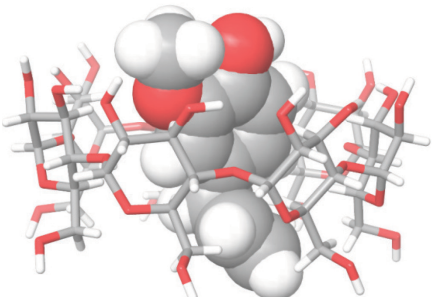
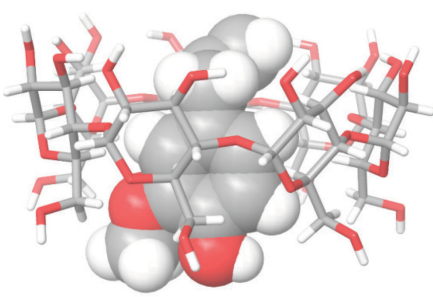
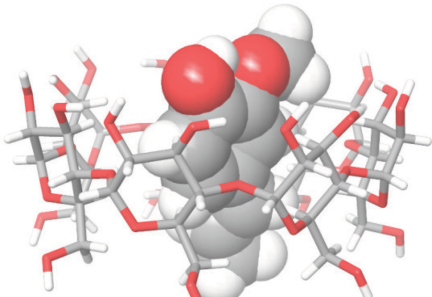
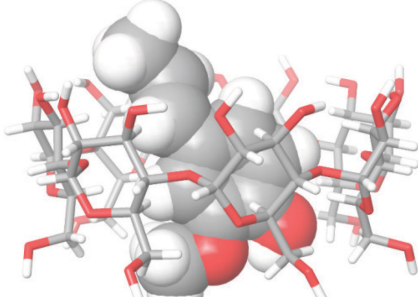
- Champ de force : MMFFs
- Milieu aqueux avec une constante diélectrique de 78.0 (modèle implicite GB/SA)
- Molécule de β -CD maintenue rigide
- Méthode de minimisation : (FMNR *conjugate gradient minimization*, convergence fixée à 0,01 kJ Å⁻¹ mol⁻¹) avec un maximum d'itérations de 1000
- Méthode d'échantillonnage : *Mixed torsional/Low mode sampling*
- 5000 conformations générées.

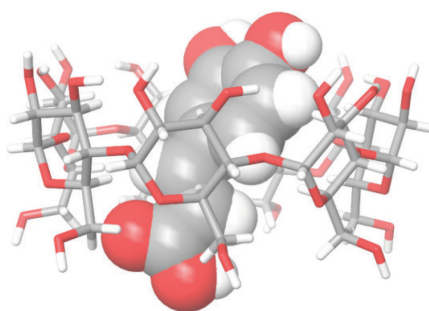
V.2. Résultats et discussion

Les valeurs d'énergie obtenues en mécanique moléculaire n'ont aucun sens physique dans l'absolu ; c'est uniquement la comparaison entre deux valeurs obtenues pour deux conformations différentes qui est interprétable. La différence d'énergie totale (ΔE , kJ/mol) est calculée entre celle du complexe d'inclusion et la somme des énergies des partenaires libres (CD et PP) du complexe dans leur forme minimisée ($\Delta E = E_{CD/PP} - (E_{CD} + E_{PP})$). Cette différence d'énergie (ΔE) constitue un paramètre théorique qui permet d'évaluer l'énergie de complexation et trouver la conformation la plus stable du complexe. Les conformations les plus stables de chaque complexe d'inclusion issues des deux stratégies d'inclusion ou de "docking" ainsi que les énergies de complexation correspondantes (ΔE) sont présentées dans le Tableau V.1.

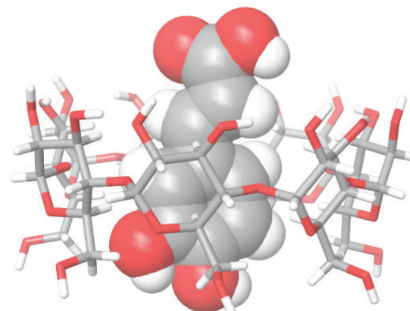
L'inclusion des molécules invitées dans la cavité de la CD est favorisée à l'extrémité la plus large de la CD. La raison est que cette région offre une surface plus importante pour que l'invité, quel que soit son mode d'inclusion, puisse se positionner à l'intérieur de la cavité. Nous observons dans le Tableau V.1 un phénomène de bi-modalité pour chacun des PPs étudiés. Cela indique l'existence de deux types de complexes d'inclusion 1:1 en solution selon l'orientation relative des deux molécules constituant le complexe d'inclusion. Ce phénomène est également observé dans la littérature (Lawtrakul *et al*, 2014).

Tableau V.1. Représentation des conformères les plus stables des complexes d'inclusion CD/PP issus des deux modes d'inclusion.

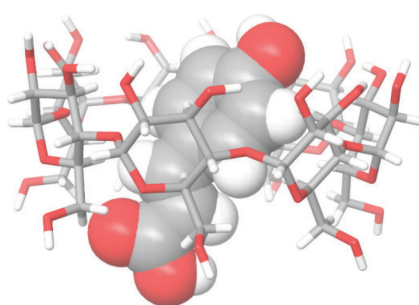
Hôte/invité	ΔE (kJ/mol)	
	Complexe d'inclusion E1	Complexe d'inclusion E2
β -CD/ <i>trans</i> - anéthol	 -57,5	 -55,8
β -CD/ estragole	 -46,0	 -43,5
β -CD/ eugénol	 -45,1	 -46,7
β -CD/ isoeugénol	 -50,8	 -49,8

β -CD/acide
caféique

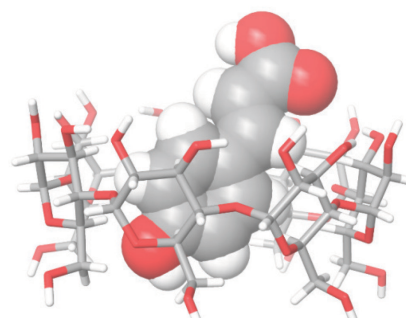
-33,3



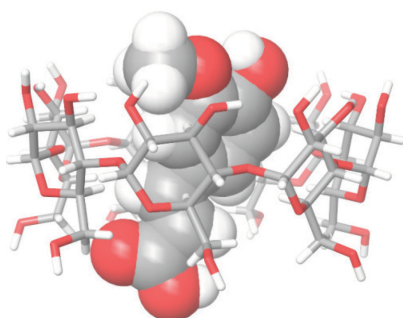
-34,6

 β -CD/acide
p-
coumarique

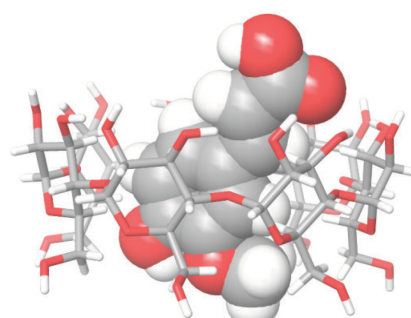
-38,3



-38,7

 β -CD/
acide
fêrulique

-32,1



-28,0

Après inclusion, nous remarquons que tous les PPs, dans les deux orientations, exposent une partie de leur structure à la face large comme étroite de la CD. Cela montre que les molécules pénètrent profondément dans la cavité de la CD et que le noyau aromatique des invités est bien inclut dans le centre de la cavité de la CD. Cela confirme que la formation des complexes d'inclusion met en jeu principalement des interactions hydrophobes entre le noyau aromatique et la cavité apolaire de CD. Les groupements exposés à l'extérieur de la cavité sont généralement les substituants hydrophiles tels que les groupements hydroxyles ou carbonyles. La solvation de ces groupements à l'extérieur de la cavité de CD contribue à la stabilisation du complexe

formé alors que leur inclusion dans la cavité de la CD empêche ce phénomène et déstabilise le complexe. Nos observations sont en bon accord avec la littérature où différents auteurs ont étudié des complexes d'inclusion entre les CDs et les PPs (Anselmi *et al*, 2008 ; Decock *et al*, 2006 ; Nuchuchua *et al*, 2009 ; Zhang *et al*, 2009a ; Zhang *et al*, 2009b),

En évaluant les énergies de complexation ou d'interaction, nous pouvons conclure que les deux modèles de complexes coexistent et présentent des stabilités similaires. Nous ne pouvons pas conclure sur l'effet du remplissage de la cavité de la CD sur la stabilité des complexes d'inclusion comme le cas des travaux précédents (Fourmentin *et al*, 2013) car les PPs étudiés présentent un même squelette de base et ne montre pas de différence considérable dans leur volume moléculaire.

En regardant la position relative des groupements des invités par rapport à la CD, nous pouvons conclure sur la nature des interactions mises en jeu durant la complexation. Nous observons que le noyau aromatique des invités est en contact avec la cavité hydrophobe de la CD confirmant ainsi la présence des interactions hydrophobes entre les composants du complexe. De plus, nous pouvons facilement remarquer que les molécules invitées s'orientent de façon à ce que leurs oxygènes se rapprochent et entrent en contact avec les groupements hydroxyles de la CD pour créer des liaisons hydrogènes. Cela indique que les interactions hydrophobes et les liaisons hydrogènes jouent un rôle majeur dans la formation des complexes d'inclusion entre la CD et les PPs étudiés dans ce travail.

Aucune corrélation n'est trouvée entre les valeurs de ΔE et les K_f calculées. Cela est dû au fait que la réaction de complexation est contrôlée par la variation d'enthalpie libre (ΔG). ΔG s'exprime de la façon suivante :

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad \text{V.1}$$

avec ΔG : variation d'énergie libre de Gibbs ; ΔH : variation d'enthalpie ; ΔS : variation d'entropie.

Or durant le phénomène de complexation, nous avons deux énergies qui entrent en jeu, l'énergie d'interaction et l'énergie de solvation. Par conséquent l'équation V.1 peut être développée de la manière suivante :

$$\Delta G = \Delta H_{\text{int}} + \Delta H_{\text{sol}} - T\Delta S_{\text{int}} - T\Delta S_{\text{sol}} \quad \text{V.2}$$

avec ΔH_{int} et ΔH_{sol} : les variations d'enthalpie correspondant à l'interaction entre la CD et l'invité et à la solvation du complexe formé, respectivement ; T : la température ; ΔS_{int} et ΔS_{sol} : les différences d'entropie correspondant à l'interaction entre la CD et l'invité et à la solvation du complexe formé, respectivement.

Toutefois, les résultats issus de nos simulations ne traduisent que l'enthalpie d'interaction et l'enthalpie libre de solvation, et pas l'entropie d'interaction. Par conséquent, les valeurs de ΔE calculées ne seront pas forcément corrélées avec les valeurs expérimentales de K_f .

Cette étude théorique nous a permis de mettre en évidence la réalité de l'inclusion ainsi que de confirmer les résultats et les données expérimentaux. Après simulation, il s'avère que tous les invités étudiés conduisent à un vrai phénomène d'inclusion. De plus, les résultats montrent que la β -CD présente une bonne capacité d'inclusion des invités dans les deux orientations possibles ce qui aboutit à un phénomène de bi-modalité de chacun des complexes d'inclusion. Cette observation est cohérente avec les résultats expérimentaux de spectroscopie RMN présentés dans le chapitre III.

V.3. Conclusion

L'ensemble des études expérimentales et théoriques dans ce chapitre et les chapitres précédents nous ont permis de mettre en évidence la formation de complexes d'inclusion des PPs avec diverses CDs en solution et à l'état solide.

Nous nous sommes intéressés dans la suite de cette étude à exploiter l'effet de l'encapsulation sur la libération prolongée des PPs volatiles sous différentes conditions. Nous nous sommes également attachés à démontrer l'effet de l'inclusion dans les CDs sur la protection des PPs contre les agressions du milieu extérieur et par conséquent l'augmentation de leur stabilité.

Il nous a également semblé intéressant de poursuivre cette étude pour l'évaluation de l'effet des CDs sur les différentes propriétés biologiques des PPs telles l'activité antioxydante ou la capacité de piégeage des radicaux libres, l'activité antifongique ainsi qu'antibactérienne. Tous ces points seront examinés et discutés en détail dans les chapitres suivants.

Partie 3. Effets de l'encapsulation sur les propriétés des PPs.

Chapitre VI. Effets de l'encapsulation sur les caractéristiques physicochimiques des PPs.

Un facteur primordial dans le domaine agroalimentaire est la maîtrise des qualités nutritionnelles et organoleptiques du produit (retenir et protéger les arômes et les saveurs, éviter les contaminations microbiennes, etc.). Cela est étroitement lié aux paramètres physico-chimiques et sensorielles des ingrédients et conduit à une acceptabilité positive par le consommateur et donc à la réussite du produit.

De nos jours, nous observons une recrudescence de l'utilisation des emballages actifs et intelligents connus sous le terme de "*Smart Packaging*" au profit des emballages classiques. Ces matériaux d'emballage reconnus par la directive européenne (1935/2004/EC) permettent une meilleure conservation des aliments frais, une réduction des processus de dégradation et une diminution de la quantité de conservateurs ajoutés à l'aliment. Parmi ces emballages nous avons, par exemple, les emballages hermétiques contenant un mélange gazeux spécial ("*Modified Atmosphere Packaging*" ou MAP) et les emballages perméables à air conditionné et contrôlé ("*Equilibrium Modified Atmosphere Packaging*" ou EMAP). Ces emballages sont conçus pour la viande fraîche et le poisson mais également pour les fruits et légumes ainsi que le fromage et les plats préparés (Caleb *et al*, 2012 ; Kour *et al*, 2013). Ils conditionnent l'air au sein du produit alimentaire et nécessitent par conséquent la présence d'un espace de tête (volume de gaz situé entre l'aliment et l'emballage). Il a été démontré, par exemple, que l'utilisation des emballages MAP réduit considérablement la croissance des espèces de *Listeria* et de *Salmonella* dans la viande rouge et la viande de poulet (Arvanitoyannis & Stratakis, 2012). Comme la seule variable est la composition du mélange gazeux, il sera possible d'incorporer dans ces emballages des molécules volatiles dotées d'une capacité aromatisante ainsi qu'antimicrobienne. La molécule peut par la suite être libérée et diffuser dans le produit alimentaire en fonction de la température, l'humidité, la présence d'éthanol, etc. (Otero-Pazos *et al*, 2014). De plus, l'incorporation des molécules actives dans les emballages sous forme encapsulée permet de les protéger davantage et de contrôler leur libération dans l'espace de tête du produit alimentaire (Maswal & Dar, 2014).

Les excipients utilisés dans les formulations pharmaceutiques quant à eux doivent, en plus de l'amélioration de la solubilité, de la dissolution et de la biodisponibilité du PA, lui offrir un effet stabilisateur et protecteur (Grohganz *et al*, 2013 ; Narang *et al*, 2012).

L'application de l'encapsulation par les CDs dans les domaines agroalimentaire et pharmaceutique permet d'établir une barrière entre l'invité et le milieu environnant et donc de le protéger contre les agressions extérieures (Marques, 2010 ; Pinho *et al*, 2014).

Dans cette partie, nous nous sommes intéressés à étudier l'effet de l'encapsulation par les CDs sur certaines propriétés physicochimiques et biologiques des PPs. Dans ce chapitre, nous avons évalué l'effet protecteur des CDs sur la dégradation des PPs en solution ou dans les complexes d'inclusion solides contre les irradiations UVC. L'effet de l'encapsulation sur la cinétique de libération ou de volatilisation des PPs, les pertes de PP durant la manipulation des complexes d'inclusion à température élevée ont été également évaluées. De plus, nous avons étudié l'influence de l'humidité relative (HR%) du milieu sur la dissociation du complexe d'inclusion solide et la libération de l'invité. Dans le chapitre suivant, des études *in vitro* des activités antioxydante, antifongique et antibactérienne des PPs à l'état libre ou complexé ont été réalisées.

VI.1. Expériences de photodégradation

VI.1.1. Méthodologie

Les expériences de photodégradation ont été menées sur les complexes d'inclusion en solution ou à l'état solide (lyophilisé) avec les différentes CDs (α -CD, β -CD, HP- β -CD, RAMEB et CRYSMEB). Dans le cas des complexes d'inclusion en solution, les PPs sont dissouts dans l'eau ou dans une solution de 10 mM de CD en se basant sur les résultats des études de phase de solubilité. Les solutions sont agitées, filtrées (0,45 μ m) et introduites par la suite dans un photoréacteur pour les expériences de photodégradation. Dans le cas des complexes d'inclusion solides, les complexes lyophilisés ou les mélanges physiques sont étalés sur un verre de montre et soumis au rayonnement UVC. L'irradiation est réalisée à l'aide d'un appareil Multirays (Heliosquartz) équipé de 10 lampes UVC (254 nm, 15 W chacune). Un prélèvement est effectué régulièrement. Les aliquotes liquides sont dilués alors que les complexes d'inclusion solides et les mélanges physiques sont dissouts dans l'eau avant l'analyse par HS-CG. La dilution ou la dissolution permettent la dissociation du complexe d'inclusion et donc de s'affranchir à l'effet de

la CD. Cela permet, par conséquent, la détermination de la quantité de PP restante sans aucune ambiguïté. La quantité de PP restant intacte en fonction du temps d'irradiation est déterminée à partir de l'aire du pic chromatographique obtenu à chaque intervalle de temps t suivant l'équation suivante :

$$\text{PP restant (\%)} = \frac{C_t}{C_0} \times 100 \quad \text{VI.1}$$

avec C_t et C_0 : la quantité restante de PP au temps du prélèvement t et la quantité initiale du PP au temps 0 d'irradiation, respectivement. Les profils de dégradation des PPs en présence de CD sont comparés au profil de dégradation du PP libre dans l'eau alors que ceux des complexes d'inclusion solides sont comparés à ceux des mélanges physiques correspondants.

VI.1.2. Résultats et discussion

Les PPs sont sensibles à la chaleur et à la lumière. Cette sensibilité entraîne des processus d'isomérisation, de dimérisation, de dégradation, etc. (Turek & Stintzing, 2012). Dans ce travail, nous avons suivi la stabilité des PPs libres et encapsulés en solution ou en forme de complexes d'inclusion solides au cours du temps sous irradiation UVC. A chaque intervalle de temps d'irradiation, la quantité de PP restant intacte est déterminée selon l'équation VI.1. La Figure VI.I montre les profils de photodégradation des PPs libres ou encapsulés.

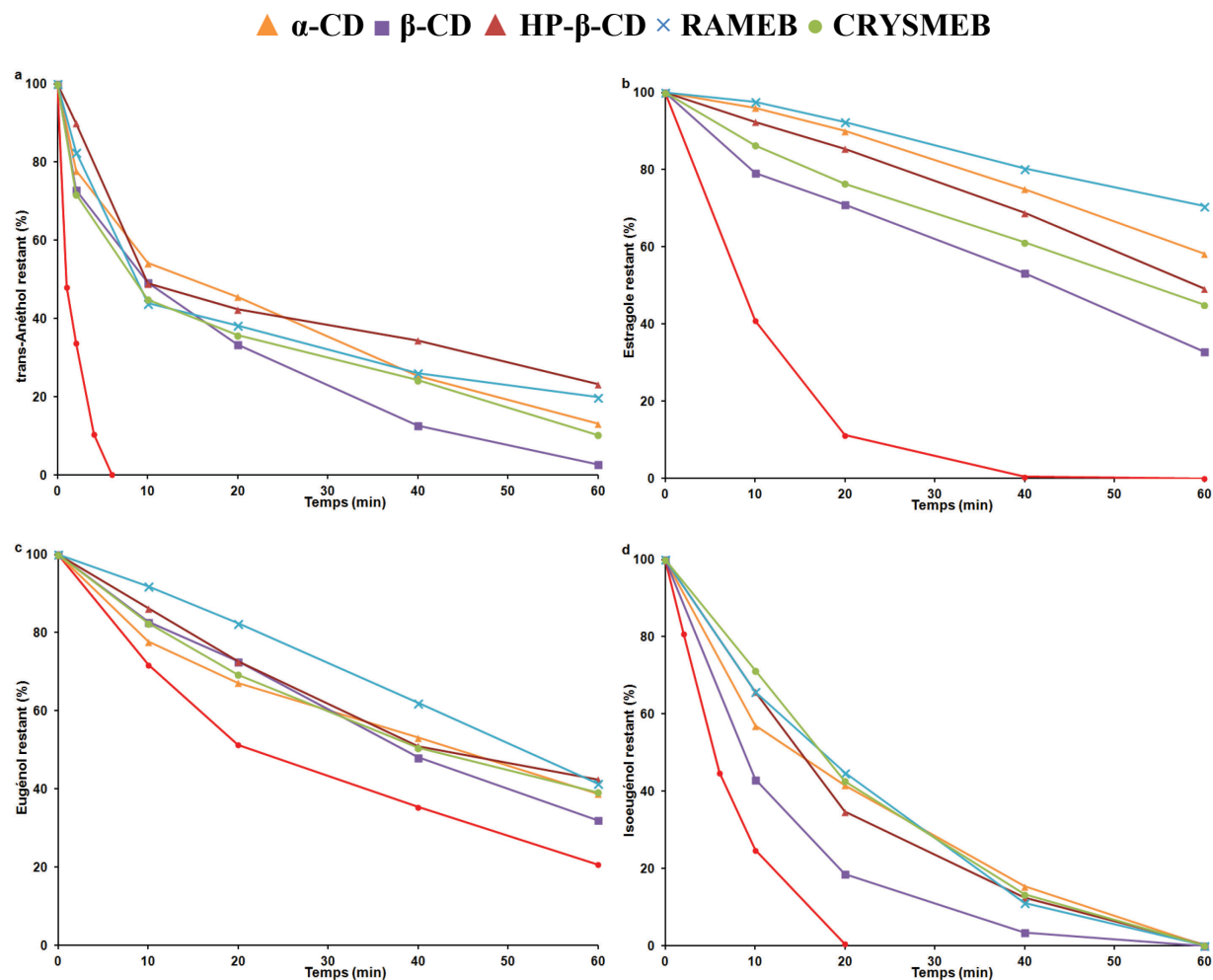


Figure VI.1. Profils de photodégradation des PPs : a) *trans*-anéthol, b) estragole, c) eugénol et d) isoeugénol libres ou encapsulés en solution.

Les profils de photodégradation de ces PPs sous forme libre ou complexée suivent une cinétique du premier ordre. Cela nous permet de calculer les constantes de vitesse de dégradation T (min^{-1}) regroupées dans le Tableau VI.1.

Tableau VI.1. Constantes de vitesse de dégradation T (min^{-1}) des PPs libres ou complexés en solution sous irradiation UVC.

T (min^{-1})	<i>trans</i> -Anéthol	Estragole	Eugénol	Isoeugénol
libre	0,9749	0,1092	0,0268	0,1413
α -CD	0,0314	0,0091	0,0149	0,0458
β -CD	0,0559	0,0176	0,0189	0,0836
HP- β -CD	0,0222	0,0117	0,0148	0,0529
RAMEB	0,0250	0,0061	0,0147	0,0551
CRYSMEB	0,0334	0,0130	0,0156	0,0514

En comparant la stabilité des PPs libres entre eux, nous pouvons remarquer que le *trans*-anéthol, l'estragole et l'isoeugénol sont totalement dégradés au bout de 6, 40 et 20 min, respectivement, alors que 20 % d'eugénol reste intact après 60 min d'irradiation (Figure VI. 1).

Une valeur élevée de T indique une photosensibilité accrue du composé. L'analyse des valeurs de T dans le Tableau VI.1 permet de conclure que le *trans*-anéthol est de loin le plus sensible à la photodégradation alors que l'eugénol présente la meilleure stabilité. En comparant les couples d'isomères, *trans*-anéthol/estragole et eugénol/isoeugénol, où la seule différence dans la structure est la position de la double liaison dans la chaîne propényle, nous remarquons que la position de cette dernière affecte considérablement la stabilité du PP. Les PPs ayant la double liaison conjuguée au noyau aromatique présentent une cinétique de dégradation plus importante que leurs homologues renfermant un groupement vinyle où la double liaison n'est pas conjuguée au cycle aromatique : $T_{\text{trans-anéthol}} > T_{\text{estragole}}$ et $T_{\text{isoeugénol}} > T_{\text{eugénol}}$. Cela est lié à l'interconversion des formes isomères *trans* et *cis* du *trans*-anéthol et du *trans*-isoeugénol (Figure VI. 2). En fait, conjointement à la disparition du *trans*-anéthol et du *trans*-isoeugénol, l'apparition des pics chromatographiques correspondant au *cis*-anéthol et au *cis*-isoeugénol est détectée dans les chromatogrammes respectifs.

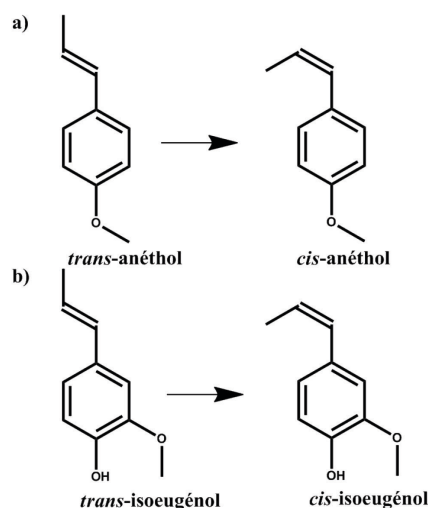


Figure VI.2. Schéma représentatif de l'interconversion *trans/cis* de a) l'anéthol et de b) l'isoeugénol.

Le processus d'isomérisation *cis/trans* est l'un des phénomènes les plus fréquemment rencontrés en photochimie organique (Castro *et al*, 2010). Notons que les isomères *cis* sont généralement plus toxiques que les isomères *trans* et qu'ils possèdent des odeurs et saveurs fort

désagréables (Turek & Stintzing, 2012). Le *cis*-anéthol présente, par exemple, une toxicité 10 fois plus importante que le *trans*-anéthol (Carteau, 2006). Cela rend les produits contenant les composés dégradés impropres à la consommation dans les domaines pharmaceutique, cosmétique, alimentaire ou autres.

Quant à l'effet des CDs sur la stabilité des PPs, l'analyse des profils de dégradation des PPs libres et encapsulés (Figure VI.1) et les valeurs de T (Tableau VI.1) montre clairement leurs effets protecteurs. En effet, la complexation ralentit considérablement la photodégradation des PPs. Après 60 min d'irradiation des PPs encapsulés, 3 à 24% de *trans*-anéthol, 33 à 71% d'estragole et 32 à 43% d'eugénol restent intacts (notons que la totalité du *trans*-anéthol, de l'estragole et 80 % d'eugénol disparaît au bout de 6, 40 et 60 min, respectivement). Quant à l'isoeugénol dans ses complexes avec les CDs, il est dégradé au bout de 60 min alors que la forme libre disparaît beaucoup plus rapidement (après 20 min). En comparant les vitesses de dégradation des PPs, nous remarquons que l'encapsulation par les différents CDs permet d'accroître la stabilité du *trans*-anéthol, de l'estragole, de l'eugénol et de l'isoeugénol de 18 à 44, 6 à 18, 1,5 à 2 et 1,6 à 3 fois, respectivement. L'effet protecteur le plus prononcé des CDs est donc observé dans le cas de du *trans*-anéthol.

Cependant, il est difficile de relier ces résultats aux valeurs de K_f des complexes correspondants. Nous pouvons, par conséquent, conclure que l'effet de la complexation sur la stabilité du PP dépend à la fois de sa stabilité intrinsèque ainsi que de sa capacité à former un complexe d'inclusion avec la CD en question. Des résultats similaires sont reportés dans la littérature. Ainsi, la stabilité de l'acide *trans*-fêrulique traitée par UVB a été montrée d'augmenter de 5 fois en présence d'HP- β -CD (Wang *et al*, 2011b).

La photodégradation des complexes d'inclusion solides a été également suivie et comparée aux mélanges physiques (la préparation des complexes d'inclusion et des mélanges physiques est décrite dans les paragraphes IV.1 et IV 2). Les profils de photodégradation du *trans*-anéthol et de l'estragole dans leurs complexes d'inclusion et mélanges physiques sont présentés dans la Figure VI.3.

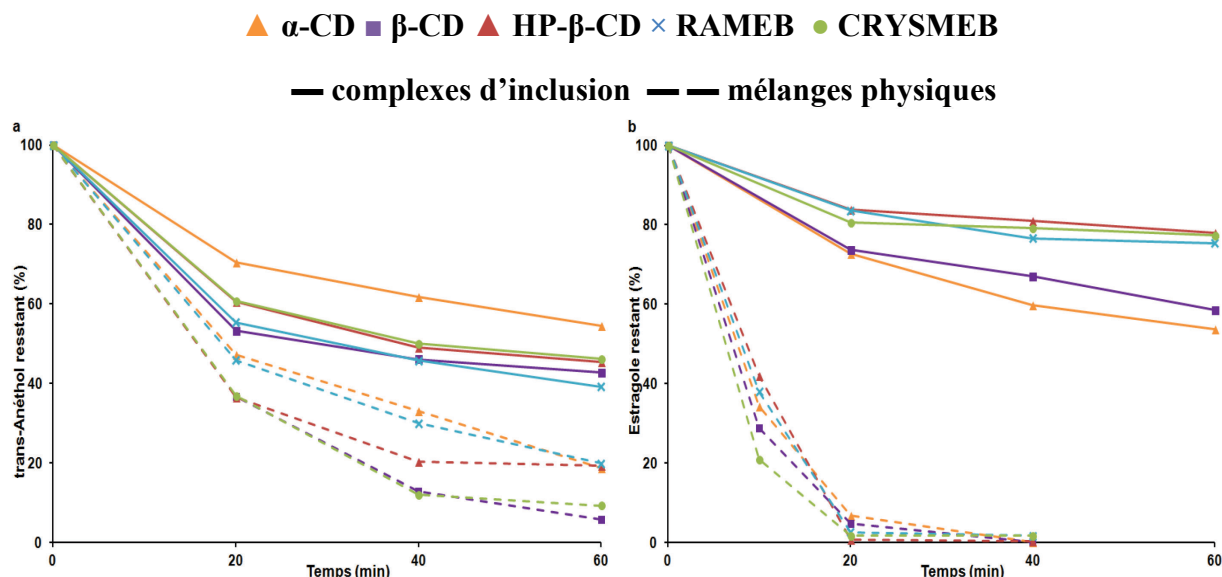


Figure VI.3. Profils de photodégradation du a) *trans*-anéthol et de b) l'estragole dans les complexes d'inclusion solides et les mélanges physiques.

La Figure VI.3 montre clairement l'effet photoprotecteur de l'encapsulation en comparant les profils des complexes d'inclusion à ceux des mélanges physiques. La dégradation des PP suit une cinétique d'ordre un. Les valeurs de T du *trans*-anéthol et de l'estragole dans leurs complexes d'inclusion et dans les mélanges physiques correspondants sont calculées et regroupées dans le Tableau VI.2.

Tableau VI.2. Constantes de vitesse de dégradation T (min^{-1}) des PP dans les complexes d'inclusion solides et les mélanges physiques sous irradiation UVC.

T (min^{-1})	<i>trans</i> -anéthol		estragole	
	complexe	mélange physique	complexe	mélange physique
α -CD	0,0096	0,0271	0,0097	0,1341
β -CD	0,0124	0,0494	0,0080	0,1523
HP- β -CD	0,0129	0,0276	0,0088	0,2009
RAMEB	0,0134	0,0263	0,0069	0,1829
CRYSMEB	0,0112	0,0427	0,0108	0,2009

Les résultats montrent que les complexes d'inclusion avec toutes les CDs étudiées ralentissent considérablement la photodégradation des PP vis-à-vis des mélanges physiques correspondants. Les valeurs de T indiquent que la complexation avec les différentes CDs augmente la stabilité du *trans*-anéthol et de l'estragole de 2 à 4 et de 14 à 23 fois,

respectivement. La complexation conduit par conséquent à l'augmentation de la demi-vie des PPs. Les mélanges physiques présentent des demi-vies relativement courtes allant de 14 à 26 min pour le *trans*-anéthol et de 3 à 5 min pour l'estragole. Le fait que le *trans*-anéthol présente des demi-vies plus élevées que l'estragole peut être dû à la très faible stabilité intrinsèque du *trans*-anéthol et la présence de CDs même sous forme de mélanges physiques permet de le protéger.

Ces demi-vies sont fortement améliorées en raison de l'encapsulation et atteignent 52-72 min dans le cas du *trans*-anéthol et 64-100 min dans le cas de l'estragole. A notre connaissance, c'est la première fois que l'effet de la complexation sur la photodégradation des invités a été étudié à l'état solide.

Nos résultats montrent l'importance de l'encapsulation, en solution ou sous forme solide, sur la réduction de la vitesse de photodégradation des PPs photosensibles et leur protection contre les irradiations UVC. Cela peut être attribué principalement à la barrière physique conférée aux PPs par les CDs. Cet effet photoprotecteur est constamment recherché par les industries alimentaire, pharmaceutique et cosmétique. La protection des composés labiles contre la photodégradation initiée par les conditions stressantes (chaleur, lumière, humidité, etc.) de préparation ou de stockage du produit est d'une ultime importance économique. De plus, il a été démontré que la photo-oxydation de l'estragole peut générer des aérosols organiques secondaires (SOA) (Pereira *et al*, 2014). La formation de ces derniers produit des effets néfastes sur le changement climatique et la santé publique (Davidson *et al*, 2005 ; Solomon *et al*, 2007). Nos résultats suggèrent que les CDs, en vue de leur effet protecteur, pourraient être appliqués dans le domaine environnemental pour limiter la production des polluants tels que les SOA.

VI.2. Etudes de libération par volatilisation à température ambiante

VI.2.1. Méthodologie

Les études de libération sont menées selon l'une des pratiques de l'aromathérapie (méthode d'"enveloppement") qui consiste à vaporiser et répartir des gouttes d'HEs mélangées à l'eau sur un drap ou une serviette et s'envelopper (Cusson, 2007). La libération des PPs (*trans*-anéthol et estragole) à partir des solutions aqueuses de complexes d'inclusion avec les différentes CDs (α -CD, β -CD, HP- β -CD, RAMEB et CRYSMEB) est suivie par la technique d'HS-CG. En se basant sur les résultats obtenus par l'étude de phase de solubilité, des solutions de PPs sont préparées dans l'eau ou en présence de 10 mM de CD. Les solutions sont ensuite filtrées (0,45

µm) et réparties également sur des filtres identiques déposés préalablement dans des vials (Figure VI.4).



Figure VI.4. Etude de libération par volatilisation à température ambiante.

Les vials sont laissés ouverts à température ambiante pour permettre la volatilisation des PPs. A chaque intervalle de temps t , les vials sont scellés et analysés par HS-CG. La quantité de PP résiduelle dans chaque échantillon est déterminée en comparant l'aire du pic chromatographique obtenue à chaque temps t à celui du t_0 comme suit :

$$\text{PP résiduel \%} = \frac{A_t}{A_0} \times 100 \quad \text{VI.2}$$

avec A_t et A_0 : les aires des pics chromatographiques du PP à temps t et t_0 . Les profils de libération du PP à partir des complexes d'inclusion en solution sont comparés au profil de libération du PP libre dans l'eau.

VI.2.2. Résultats et discussion

Nous avons évalué l'effet de la l'encapsulation par les CDs sur la modulation de la libération des PPs volatils selon les pratiques utilisés en aromathérapie. La cinétique de libération des PPs volatils dans la phase gazeuse est déterminée en suivant les quantités de PP dans l'espace de tête

selon l'équation VI.2. La quantité de PP présente dans l'espace de tête est proportionnelle à la quantité résiduelle de PP sur le filtre. Les profils de libération du *trans*-anéthol et de l'estragole libres et encapsulés sont illustrés dans la Figure VI.5. Nous pouvons constater que les profils de libération des invités libres et encapsulés suivent une cinétique du premier ordre (Figure VI.5).

Les constantes de vitesses de libération (V) du *trans*-anéthol et de l'estragole libres et encapsulées sont calculées et reportées dans le Tableau VI.3.

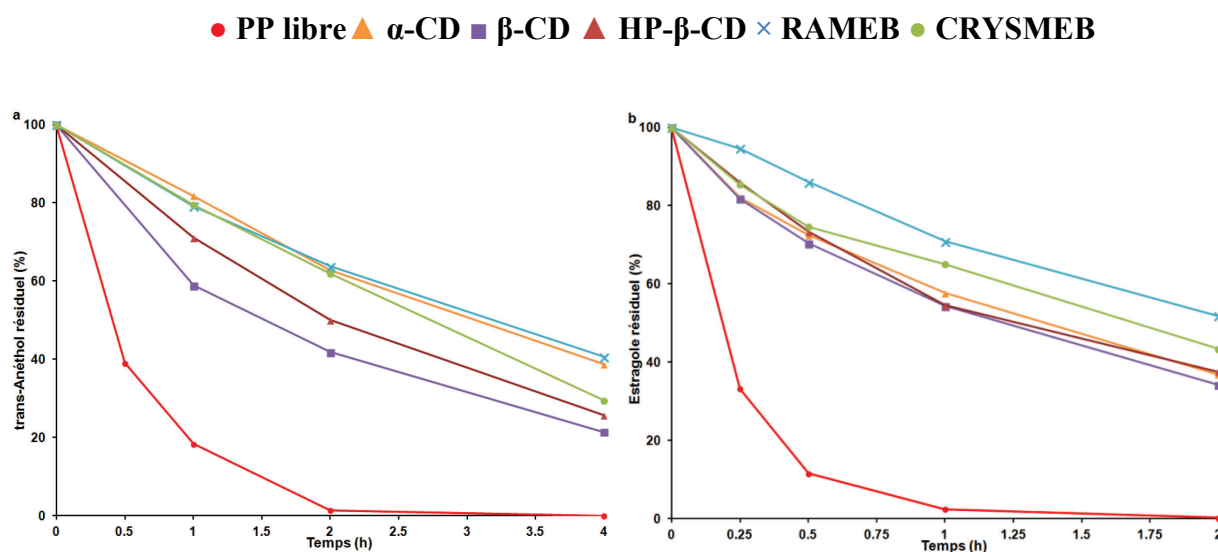


Figure VI.5. Profils de libération du a) *trans*-anéthol et de b) l'estragole libres ou encapsulés en solution.

Plus la valeur de V est élevée plus la volatilité du composé est importante. Nous remarquons que l'estragole est plus volatil que le *trans*-anéthol. Cela est tout à fait cohérent avec les résultats obtenus pour les constantes de Henry (Hc) (Paragraphe III.1.2).

Après 1 h de volatilisation à température ambiante, les quantités de *trans*-anéthol et d'estragole libres résiduelles sur le filtre sont de 18 et 2,5 %, respectivement, alors que l'encapsulation par les CDs permet de retenir 58 à 82 % de *trans*-anéthol et 54 à 71% d'estragole sur le filtre. Les valeurs de V du *trans*-anéthol et de l'estragole sont réduites entre 6 à 10 fois et 7 à 11 fois (Tableau VI.3) suite à l'encapsulation par les CDs. Suivant les résultats de la littérature, les CDs peuvent réduire considérablement la volatilité des composés volatils (Ciobanu *et al*, 2012; Ciobanu *et al*, 2013b; Yuan *et al*, 2014).

Tableau VI.3. Constantes de libération V (min^{-1}) des PPs en solution à température ambiante sous forme libre et encapsulée.

V	<i>trans</i>-anéthol	estragole
libre	0,0355	0,0617
α -CD	0,0040	0,0080
β -CD	0,0063	0,0087
HP- β -CD	0,0057	0,0081
RAMEB	0,0037	0,0056
CRYSMEB	0,0051	0,0067

Nous pouvons ainsi conclure que l'encapsulation par les CDs retient les PPs et réduit leur volatilité avec une grande efficacité et sur une période de temps plus importante. Cela montre, que les CDs jouent le rôle d'un réservoir de molécules volatiles et permettent une libération prolongée et retardée des invités par rapport à leur forme libre. Les techniques de libération prolongée sont d'une grande importance dans les domaines pharmaceutique, alimentaire et cosmétique (São Pedro *et al*, 2013). La libération retardée offre l'avantage de prolonger l'effet des produits encapsulés et d'optimiser leurs performances. La physicochimie de la libération des molécules aromatiques a toujours suscité un intérêt particulier (Taylor, 1998) surtout dans le domaine de l'aromathérapie.

Les complexes d'inclusion avec les CDs permettent de prolonger l'effet de l'HE mais également de répartir uniformément l'HE sur les draps de bain, les serviettes, et

VI.3. Etudes de libération à 100 °C

VI.3.1. Méthodologie

Nous avons utilisé la MHE pour suivre le comportement et évaluer les pertes des PPs dans leurs complexes d'inclusion solides ou les mélanges physiques sous chauffage à 100 °C. Dix mg de complexe d'inclusion solide ou de mélange physique sont placés dans des vials scellés pour subir une série de MHE à 100 °C. Chaque échantillonnage en MHE correspondant à un intervalle de temps précis. Les quantités de PP résiduelles dans chaque échantillon sont déterminées en comparant l'aire du pic chromatographique obtenue à chaque temps t à celui du t_0 conformément à l'équation VI.2. Les profils de libération des complexes d'inclusion solides sont comparés à ceux des mélanges physiques ainsi que du PP seul.

VI.3.2. Résultats et discussion

Les différentes pertes associées à une manipulation à haute température doivent être prises en compte durant la formulation d'un nouveau produit. Dans ce travail, nous avons déterminé les quantités résiduelles de PP dans les complexes d'inclusion et les mélanges physiques avec les différentes CDs (α -CD, β -CD, HP- β -CD, RAMEB et CRYSMEB) en comparaison avec les PPs libres durant des intervalles réguliers de chauffage à 100 °C. Le comportement des PPs dans les complexes d'inclusion solides est comparé à celui des mélanges physiques et de l'invité correspondant sous sa forme libre. La quantité de PP présente dans l'espace de tête à chaque extraction, proportionnelle à la quantité résiduelle de PP dans l'échantillon à chaque intervalle de temps t , est calculée suivant l'équation VI.2. L'ampleur de la perte en PP peut être par conséquent déduite car l'étude est menée dans des vials fermés. Toute la quantité de PP libérée des complexes d'inclusion est donc récupérée dans l'espace de tête. Les profils montrant les quantités résiduelles des PPs à l'état libre, encapsulé ou de mélange physique sont illustrés dans la Figure VI.6.

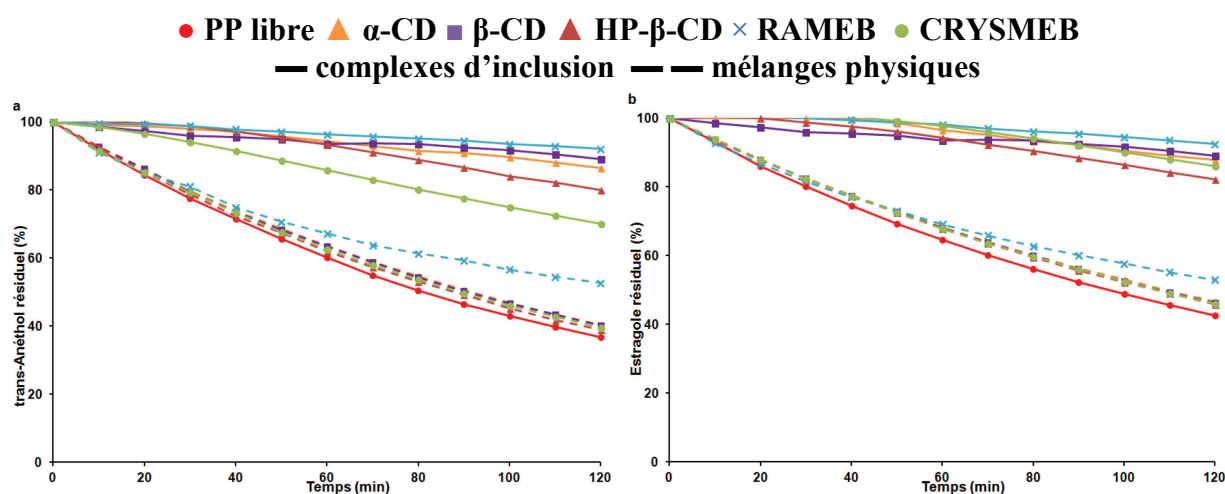


Figure VI.6. Profils de libération du a) *trans*-anéthol et de b) l'estragole libres ainsi que dans les complexes d'inclusion et dans les mélanges physiques.

Les profils des différents mélanges physiques coïncident avec le profil de l'invité libre correspondant, alors que les pertes de PPs encapsulés sont plus faibles et donc les quantités résiduelles de PP sont plus importantes.

Les complexes d'inclusion peuvent donc réduire les pertes des PPs sous manipulation à haute température. Les pertes en *trans*-anéthol et en estragole sous forme libre, après 2 h de chauffage

à 100 °C, sont de 63 et 58 %, respectivement. Les pertes de ces deux invités dans les complexes d'inclusion et dans les mélanges physiques ont été déterminées dans les mêmes conditions que leurs formes libres, et les valeurs obtenues sont reportées dans le Tableau VI.4.

Les résultats du Tableau VI.4 montrent qu'après 2h de chauffage à 100 °C, les pertes en *trans*-anéthol et en estragole dans les mélanges physiques sont proches de ceux du PP seul alors que les complexes d'inclusion retiennent une quantité de PP plus importante que celles des mélanges physiques. Les pertes en *trans*-anéthol et en estragole à partir des mélanges physiques sont, respectivement, 2 à 6 et 3 à 7 fois plus importantes que dans les complexes d'inclusion correspondants.

Tableau VI.4. Pertes (%) en *trans*-anéthol et en estragole à partir des complexes d'inclusion et des mélanges physiques après 2 h de chauffage à 100 °C.

	<i>trans</i> -anéthol		estragole	
	complexe	mélange physique	complexe	mélange physique
α -CD	13	60	12	53
β -CD	10	60	13	54
HP- β -CD	20	61	18	54
RAMEB	8	47	7	47
CRYSMEB	30	61	16	54

Nos résultats montrent que les complexes d'inclusion avec les CDs peuvent considérablement réduire les pertes des PPs même dans des conditions défavorables telles que le chauffage à 100 °C. L'encapsulation par les CDs peut avoir un intérêt majeur principalement pour la réduction des pertes des produits aromatiques volatils durant la cuisson.

Les complexes d'inclusion offrent par conséquent l'avantage de réduire les pertes des produits volatils et d'optimiser leurs performances durant la manipulation à haute température.

VI.4. Effet de l'humidité relative du milieu

VI.4.1. Méthodologie

La libération des invités volatils à partir des complexes d'inclusion lyophilisés a été suivie en fonction de l'humidité relative (HR%) de l'environnement. Dix mg de complexe d'inclusion solide sont placés dans des vials scellés dans des atmosphères à différentes HR%. Des solutions salines sursaturées de LiCl, K₂CO₃, NaBr, NaCl, KCl et K₂SO₄, sont utilisées pour générer des

atmosphères ayant des HR% de 11, 43, 60, 75, 84 et 97, respectivement. Les vials sont laissés à équilibrer pendant 8 h à l'étuve à 60 °C puis soumis à une MHE. La quantité de PP libérée ou résiduelle dans le complexe d'inclusion est calculée suivant la méthode décrite dans le paragraphe IV.3.2.

VI.4.2. Résultats et discussion

Le complexe d'inclusion β -CD/*trans*-anéthol est choisi pour étudier l'effet de l'HR% de l'atmosphère sur la libération de l'invité encapsulé. Notre choix s'est porté sur la β -CD car, similairement à la RAMEB, elle présente une importante capacité de rétention de l'invité même après 2 h de chauffage à 100°C (Tableau VI.4). Les quantités de *trans*-anéthol résiduelles dans le complexe d'inclusion après 8 h à 60 °C en fonction de l'HR% sont calculées et présentées dans la Figure VI.7.

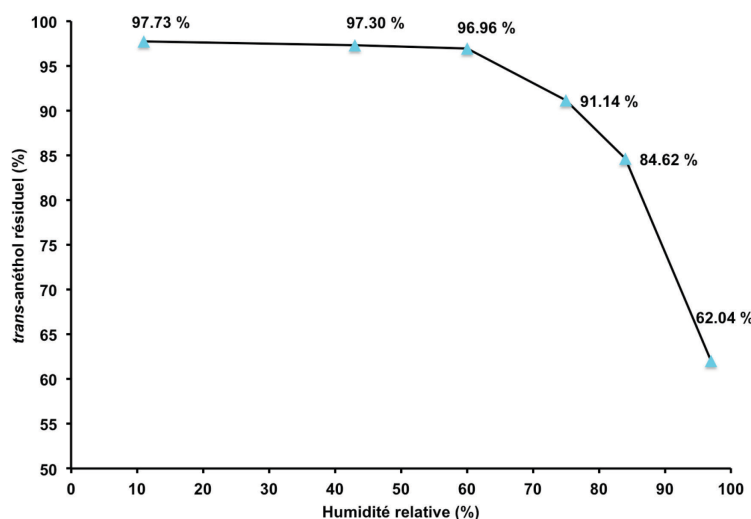


Figure VI.7. Les quantités de *trans*-anéthol résiduelles dans le complexe d'inclusion en fonction de l'HR% de l'environnement.

Nous pouvons remarquer que la libération du *trans*-anéthol du complexe d'inclusion dépend d'une façon remarquable de l'HR% du milieu environnant. Les quantités résiduelles d'invité dans le complexe d'inclusion diminuent d'une façon exponentielle avec l'augmentation de l'HR% du milieu et l'accroissement est plus important dans les milieux présentant une HR% élevée. En effet, une libération substantielle du *trans*-anéthol de son complexe d'inclusion est

favorisée au dessus de HR de 75%. Les quantités résiduelles du *trans*-anéthol dans le complexe d'inclusion après 8 h à 60 °C sont 97,73 ; 97,30 ; 96,96 ; 91,14 ; 84,62 et 62,04 % de la quantité encapsulée quand l'HR% de l'environnement est de 11, 43, 60, 75, 84 et 97%, respectivement.

Les complexes d'inclusion avec les CDs se comportent ainsi comme des systèmes de stockage pour les composés volatils tout en permettant une libération contrôlée dans certaines conditions comme, par exemple, l'HR% de l'atmosphère élevée. Les molécules d'eau présentes abondamment dans une atmosphère humide peuvent interagir et hydrater les groupements polaires de la CD et déplacer par conséquent l'équilibre de complexation entraînant la libération de l'invité. Cela confirme l'hypothèse du processus d'encapsulation qui consiste en déplacement de l'invité de la cavité de CD et son remplacement par des molécules d'eau par. Par conséquent la réhydratation de la CD permet de générer des systèmes de libération contrôlée de l'invité. Des résultats similaires sont reportés dans la littérature (del Toro-Sanchez *et al*, 2010 ; Ho *et al*, 2011). De plus, la présence de l'eau a été montrée d'être est un facteur essentiel de la libération des invités de leurs complexes d'inclusion avec les CDs (Reineccius *et al*, 2002). L'augmentation de la libération de l'invité en fonction de l'HR% de l'environnement est un facteur très important, principalement pour la formulation des emballages alimentaires. En fait, l'humidité à l'intérieur de l'emballage peut favoriser la croissance des microorganismes et par conséquent l'altération des qualités de l'aliment. Toutefois, lorsque l'augmentation d'l'HR% est accompagnée d'une libération plus importante d'un produit antimicrobien ou aromatisant, cela permet de protéger et conserver le produit alimentaire. Ces résultats montrent le potentiel et l'importance de l'utilisation des complexes d'inclusion CD/PP dans la formulation des emballages alimentaires.

Ces complexes d'inclusion disposent d'un double avantage : la formulation des agents actifs (aromatisant, antioxydant et antimicrobien) dans les emballages ainsi que le développement des systèmes de libération prolongée et contrôlée.

VI.5. Conclusion

Les résultats présentés dans ce chapitre montrent que les CDs peuvent non seulement résoudre les problèmes de solubilité des PPs mais également améliorer leur stabilité ainsi que moduler et retarder leur libération. Cela permet de mettre en œuvre des systèmes d'encapsulation

assurant la solubilisation et la protection des invités ainsi qu'une modification de la cinétique de libération, permettant ainsi de prolonger leur durée d'utilisation.

La suite de nos travaux sera consacrée à évaluer, *in vitro*, la capacité de piégeage des radicaux libres par les PPs et leurs complexes d'inclusion ainsi que leurs activités antifongique vis-à-vis de deux champignons phytopathogènes, *Fusarium oxysporum* et *Botrytis cinerea*, et antibactérienne contre *Escherichia coli*.

Chapitre VII. Effets de l'encapsulation sur les caractéristiques biologiques des PPs

Les HEs et leurs composants peuvent être considérés comme alternatives éco-compatibles et non toxiques des conservateurs alimentaires, fongicides ou antibiotiques du fait de leurs activités antioxydante, antifongique ou antibactérienne (Davidson *et al*, 2013 ; Jacometti *et al*, 2010 ; Negi, 2012). Toutefois, ces substances souffrent d'une très faible solubilité aqueuse qui limite leurs applications. Les CDs sont principalement exploitées dans les différents domaines pour leur capacité à accroître la solubilité aqueuse des invités hydrophobes suite à la formation de complexes d'inclusion. Ces complexes ont la particularité de se dissocier pour libérer la molécule piégée sans que ses propriétés ne soient altérées. Cela permet aux CDs de remplacer les surfactants ou les solvants organiques qui présentent généralement des risques pour l'homme et l'environnement. Des études ont montré que :

a) Les solvants organiques ou les surfactants usuels sont toxiques et irritants (Grant *et al*, 1992 ; Sivak *et al*, 1994) alors que les CDs ne présentent aucun impact considérable pour l'homme. De plus, la plupart des CDs sont citées dans la liste de l'Agence américaine des produits alimentaires (FDA) comme des produits GRAS (*Generally Recognized As Safe*) et dans les différentes pharmacopées (Gould & Scott, 2005 ; Kurkov & Loftsson, 2013).

b) La majorité des solvants organiques et des surfactants sont difficilement biodégradables et sont fortement absorbés par le sol (Franzetti *et al*, 2006 ; Staples, 2000) tandis que les CDs, mêmes leurs dérivés les plus stables, sont biodégradables dans les conditions favorables et sont par conséquent éco-compatibles (Fenyvesi *et al*, 2005).

c) Les solvants organiques et les surfactants constituent en eux-mêmes une pollution environnementale et sont toxiques vis-à-vis des micro-organismes du sol alors que les CDs ne présentent aucune toxicité envers la population microbienne du sol (Alter *et al*, 2003 ; Fai *et al*, 2009 ; Fava *et al*, 1998).

d) La manipulation des solvants organiques et des surfactants nécessite des mesures de sécurité pour éviter l'inflammation, les brûlures, l'intoxication, l'irritation, etc. alors que les CDs ne présentent aucun danger pour le manipulateur.

e) L'aspect économique est en faveur des CDs qui sont moins onéreuses que les solvants organiques et les surfactants.

De ce fait, les CDs peuvent remplacer les solvants organiques ou les surfactants pour la solubilisation des produits bioactifs hydrophobes en agroalimentaire, la formulation des agents antimicrobiens éco-compatibles ainsi que la vectorisation des PAs hydrophobes en pharmacie.

Ce dernier chapitre est orienté vers l'évaluation des différentes activités biologiques des PPs ainsi que de leurs complexes d'inclusion. Nous avons évalué, *in vitro*, l'activité antioxydante de ces derniers par la mesure de la capacité de piégeage des radicaux libres DPPH[•] (2,2-diphényle-1-picrylhydrazyle) et ABTS^{•+} (acide 2,2'-azinobis-3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) en comparaison avec le Trolox® (analogue structural hydrosoluble de la vitamine E). Nous avons également étudié les propriétés antifongiques et antibactériennes des PPs ainsi que de leurs complexes d'inclusion vis-à-vis de deux champignons phytopathogènes, *Fusarium oxysporum* et *Botrytis cinerea*, et de la bactérie Gram-(-) *Escherichia coli*, respectivement

VII.1. Etudes de l'activité antioxydante

Il existe une large variété de méthodes, *in vitro*, permettant d'évaluer le pouvoir antioxydant par piégeage de radicaux libres. Ces méthodes sont classées selon le mécanisme par lequel l'agent antioxydant peut réduire et désactiver le radical libre: transfert d'électron (SET, *Single Electron Transfer*) ou transfert d'atome d'hydrogène (HAT, *Hydrogen Atom Transfer*) (Prior *et al*, 2005). Nous pouvons citer parmi les méthodes les plus couramment employées (Miguel, 2010 ; Prior *et al*, 2005) :

a) Le piégeage des peroxydes ROO[•] par les méthodes ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*) et TRAP (*Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter*) qui sont de type HAT.

b) La réduction des ions ferriques par la méthode FRAP (*Ferric ion Reducing Antioxidant Parameter*) qui se fait par SET.

c) Le piégeage du radical cationique ABTS^{•+} et du radical neutre DPPH[•]. Bien que ces deux dernières méthodes soient généralement classées comme réactions SET, elles combinent les deux mécanismes (SET et HAT).

Cependant, il n'existe pas de méthode universelle qui permet de quantifier l'activité antioxydante d'un composé d'une façon bien précise. Il est recommandé, par conséquent, de combiner quelques tests complémentaires pour avoir une indication sur l'activité antioxydante du

produit testé. Dans notre travail, la capacité des PPs à piéger des radicaux libres a été évaluée vis-à-vis de deux radicaux DPPH[•] et ABTS^{•+}.

VII.1.1. Piégeage du radical libre DPPH[•]

VII.1.1.1. Principe

Le DPPH[•] (2,2-diphényle-1-picrylhydrazyle ; α,α -diphényle- β -picrylhydrazyle) est un radical libre renfermant dans sa structure un électron non apparié sur un atome du pont d'azote (Figure VII.1) . Du fait de cette délocalisation, les molécules radicalaires ne peuvent pas former de dimères, et par conséquent le DPPH[•] reste dans sa forme monomère relativement stable à température ordinaire. La délocalisation confère à la solution de DPPH[•] sa couleur violette (Gulcin, 2012). La mesure de l'activité antioxydante d'un composé se fait en suivant la diminution de la coloration violette, due à la réduction du DPPH[•] (Figure VII.1), par spectrophotométrie à une longueur d'onde entre 515 et 518 nm.

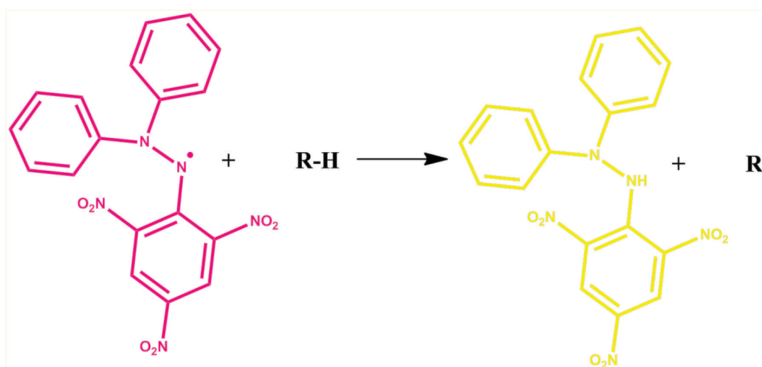


Figure VII.1. La réaction de piégeage du DPPH[•]. L'évaluation de l'efficacité d'un antioxydant se fait en mesurant la diminution de la coloration violette du DPPH[•] par spectrophotométrie.

VII.1.1.2. Méthodologie

Nous avons appliqué l'approche décrite par Brand-Williams et ses collègues (1995) pour la détermination de l'activité antioxydante des PPs et de leurs complexes d'inclusion avec certaines modifications. Une solution éthanolique de DPPH[•] (100 μ M) est préparée au moins 2 h à

l'avance car la solubilisation du radical est difficile et la solution ne se conserve pas plus de 4 à 5 jours à l'obscurité. La stabilité et la linéarité de l'absorbance de la solution de DPPH[•] sont vérifiées avant chaque analyse. En premier lieu, nous avons déterminé l'activité antioxydante des PPs à l'état libre. Des solutions de différentes concentrations de chaque PP sont préparées dans l'éthanol. Un aliquote de 1 mL de chaque solution est ensuite mélangé avec 2 mL de la solution de DPPH[•]. L'activité antioxydante du Trolox (analogue hydrophile de la vitamine E) connu pour son pouvoir anti-radicalaire est également évaluée dans les mêmes conditions. Un contrôle est préparé en mélangeant 1 mL d'éthanol avec 2 mL de la solution de DPPH[•]. Les mélanges réactionnels sont ensuite mis en agitation à 25 °C et à l'obscurité pendant 1 h. L'absorbance est ensuite enregistrée à 517 nm en utilisant un spectrophotomètre UV-Visible (Perkin Elmer Lambda 2S). L'activité antioxydante (AA%) est calculée selon la relation suivante :

$$AA\% = \left(1 - \frac{Abs_s}{Abs_0}\right) \times 100 \quad \text{VII.1}$$

avec Abs_s et Abs₀ : les absorbances de la solution à tester et du contrôle, respectivement.

Les valeurs de SC₅₀ (concentration nécessaire du produit testé pour réduire la concentration initiale de DPPH[•] de 50%) sont déduites par interpolation graphique.

Nous avons procédé par la suite à l'évaluation de l'effet de l'encapsulation par les différentes CDs sur l'activité anti-radicalaire des PPs. Pour quantifier l'effet de l'encapsulation par les CDs nous ne pouvons pas nous placer dans un milieu 100% éthanolique. De plus, la très faible solubilité des PPs dans les phases aqueuses nous ne permet pas de travailler dans des conditions concentrées en PP. Nous avons donc préparé des solutions aqueuses diluées en PP en présence ou absence de 10 mM de CD (1 mg de PP dans 50 mL d'eau ou de la solution de CD). Les solutions sont équilibrées à 25 °C pour permettre la formation des complexes d'inclusion. Des aliquotes de 2 mL de chaque solution sont mélangées à 2 mL de la solution éthanolique de DPPH[•] (100 µM). Les solutions sont mises en agitation à 25 °C et à l'obscurité. L'absorbance est ensuite mesurée après 1 h (dans le cas des complexes d'inclusion avec l'acide caféique, l'acide férulique, l'eugénol et l'isoeugénol) ou 15 h (dans le cas des complexes d'inclusion avec le *trans*-anéthol, l'estragole et l'acide *p*-coumarique) d'agitation. La cinétique de la réaction dépend de la nature de PP mais également de sa concentration donc dans le cas des PPs ayant une

activité anti-radicalaire relativement faible, un temps d'incubation plus important est nécessaire. Les absorbances des solutions testées sont comparées à l'absorbance d'un contrôle contenant 2 mL de la solution éthanolique de DPPH[•] et 2 mL d'eau pure. L'AA% est calculée conformément à l'équation VII.1.

VII.1.1.3. Résultats et discussion

La capacité des PPs à piéger le radical libre DPPH[•] a été évaluée en calculant les valeurs de SC₅₀. Il a été démontré que la vitesse de réduction des radicaux peroxydes par les phénols est fortement liée à celle de réduction du radical DPPH[•] (Marteau *et al*, 2013). L'activité antioxydante d'un composé est d'autant plus élevée que la valeur de SC₅₀ est faible. Les valeurs des SC₅₀ des PPs et du Trolox sont regroupées dans le Tableau VII.1 en comparaison avec les valeurs de la littérature (Tominaga *et al*, 2005).

Tableau VII.1. Valeurs de SC₅₀ des PPs et du Trolox pour le piégeage du radical DPPH[•] en comparaison avec les valeurs de la littérature.

Composé	SC ₅₀ (mM)
Trolox	0,015
<i>trans</i> -Anéthol	614,78
Estragole	708,03
Eugénol	0,046 (0,067 ^a)
Isoeugénol	0,031 (0,019 ^a)
Acide caféique	0,013 (0,008 ^a)
Acide <i>p</i> -coumarique	41,13
Acide férulique	0,052 (0,036 ^a)

^aTominaga *et al*, 2005

Parmi les sept PPs, l'acide caféique s'est montré le composé le plus actif. Son activité n'est pas significativement différente de celle du Trolox, ce qui confirme les données de la littérature (Nenadis *et al*, 2007). Nous pouvons classer la capacité des PPs à piéger le radical DPPH[•] par ordre décroissant suivant : acide caféique > isoeugénol > eugénol > acide férulique >> acide *p*-coumarique >> *trans*-anéthol > estragole. Nos résultats sont cohérents avec les classements démontrés dans la littérature (Brand-Williams *et al*, 1995 ; Tominaga *et al*, 2005 ; Zhao *et al*, 2011).

L'effet anti-radicalaire des PPs résulte d'une structure de donneurs de H^\bullet et semble être lié à la nature, le nombre et la position des substituants du noyau aromatique. L'acide caféique, un *ortho*-diphénol, présente la meilleure activité antioxydante parmi les PPs étudiés. Il est plus efficace que les monophénols, et particulièrement que son homologue monophénol l'acide *p*-coumarique. De plus, l'activité plus importante de l'acide férulique par rapport à l'acide *p*-coumarique est expliquée par la position en *ortho* du groupement méthoxy dans la structure de l'acide férulique ; ce groupement joue le rôle d'un donneur d'électron qui stabilise le radical formé suite à la réaction avec le DPPH $^\bullet$.

Le *trans*-anéthol et l'estragole, ne renfermant aucun groupement hydroxyle dans leur structure, présentent le plus faible pouvoir antioxydant parmi les PPs étudiés. Cela est lié à leur faible pouvoir donneur d'un H^\bullet . Nos résultats sont parfaitement cohérents avec la littérature (Brand-Williams *et al*, 1995 ; Shahat *et al*, 2011).

La conjugaison du noyau aromatique semble avoir également un effet positif sur l'activité antioxydante des PPs. Cela apparait clairement en comparant l'activité des isomères entre eux. L'isoeugénol et le *trans*-anéthol, renfermant un système conjugué dans leur structure, montrent une activité supérieure à celles de leurs isomères respectifs l'eugénol et l'estragole. Cela est dû au fait que le radical formé suite à la réaction du PP avec le DPPH $^\bullet$ est stabilisé par la résonnance de la double liaison avec le noyau aromatique.

Ces résultats confirment, par conséquent, que la capacité de piégeage des radicaux libres est proportionnelle au nombre et à la position des substituants du noyau phénolique principalement les groupements hydroxyles. Toutefois d'autres mécanismes réactionnels sont possibles surtout dans le cas des monophénols formant des structures plus au moins stables. Des réactions de transfert d'un second H^\bullet , de dimérisation ou de formation de complexes, par exemple, peuvent s'installer. Les différentes voies réactionnelles de l'eugénol avec le DPPH $^\bullet$ ont été proposées par Brand-Williams et ses collègues (1995) (Figure VII.2). Ces mécanismes peuvent expliquer en grande partie les différentes stœchiométries de réaction observées lors du piégeage des radicaux libres. Cependant ces mécanismes ne se déroulent pas dans le cas de tous les monophénols comme, par exemple, l'isoeugénol ou l'acide férulique. Cela est dû au fait que la conjugaison du noyau aromatique peut délocaliser le radical vers l'extérieur du cycle et réduire la possibilité de formation de dimères ou de complexes.

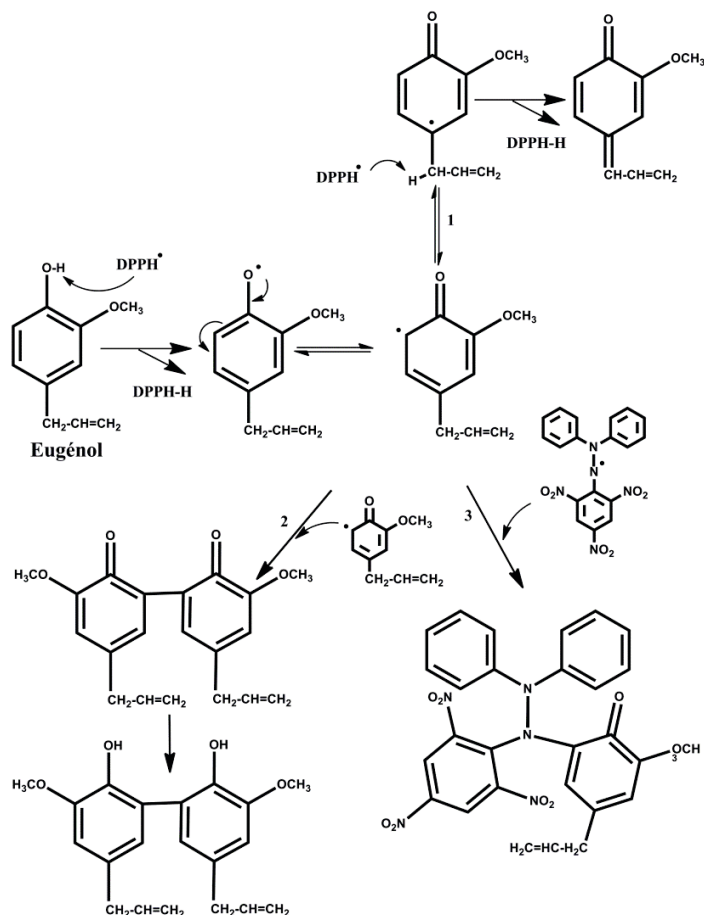


Figure VII.2. Voies réactionnelles de l'eugénol avec le DPPH[•] : 1) transfert d'un second H[•], 2) dimérisation et 3) complexation (Brand-Williams *et al*, 1995).

Dans la suite de notre travail, nous avons évalué l'effet de l'encapsulation par les CDs sur le pouvoir de piégeage du DPPH[•] par les PPs. Les valeurs d'AA% sont calculées en absence et présence de CDs selon l'équation VII.1. Les résultats obtenus sont illustrés dans la Figure VII.3.

Nous pouvons remarquer que la complexation par les différentes CDs n'entraîne par une modification considérable des valeurs de l'AA% de l'eugénol, l'isoeugénol, l'acide caféique et l'acide férulique alors qu'une légère augmentation de l'activité du *trans*-anéthol, de l'estragole et de l'acide *p*-coumarique est observée. Par conséquent, nos résultats montrent qu'après formation du complexe d'inclusion ou en d'autres termes interaction avec les CDs, les groupements actifs des PPs restent intacts et capables de réagir avec le DPPH[•]. Toute augmentation observée dans l'activité antioxydante est due probablement aux liaisons hydrogènes intermoléculaires entre les PPs et les hydroxyles des CDs. Les CDs présentent alors l'avantage de conserver l'activité

antioxydante des invités encapsulés. Des résultats similaires sont observés dans la littérature (Lucas-Abellan *et al*, 2011 ; Zhao *et al*, 2010). Cependant, il est nécessaire de signaler que l'utilisation de différentes procédures d'évaluation de l'activité antioxydante ne permet pas une comparaison fiable des résultats.

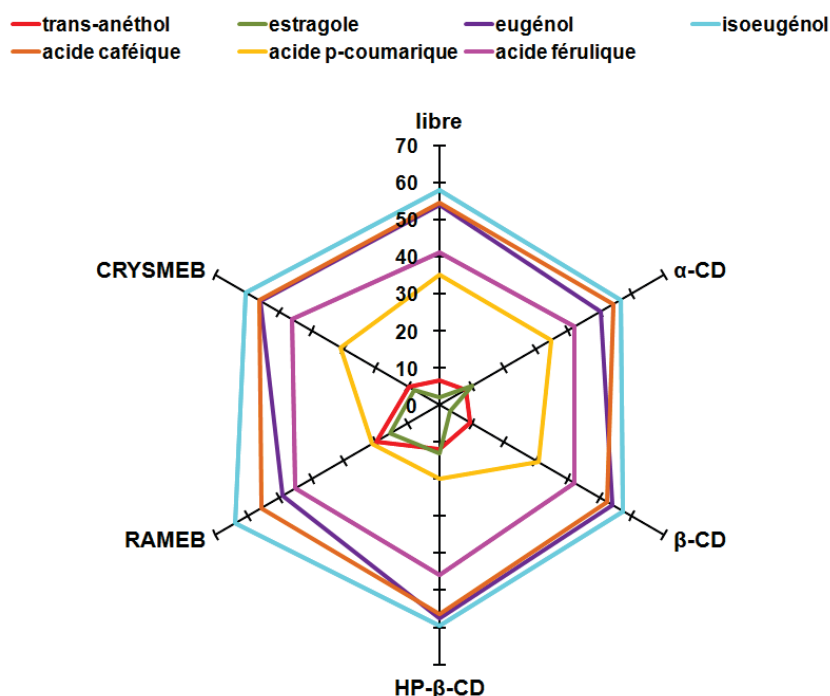


Figure VII.3. Diagramme d'activité antioxydante des PPs en l'absence et en présence de CDs.

VII.1.2. Piégeage du radical cation ABTS^{•+}

VII.1.2.1. Principe

Cette méthode est basée sur la capacité des composés à piéger le radical cation ABTS^{•+}. Ce radical doit être régénéré par arrachement d'un électron à un atome d'azote de l'ABTS incolore en utilisant différents réactifs, tel que le persulfate de potassium K₂S₂O₈ (utilisé dans notre travail), le dioxyde de manganèse, la metmyoglobine ou le peroxyde d'hydrogène (Re *et al*, 1999). Le composé à tester est ensuite ajouté au radical préformé provoquant une décoloration de la solution s'il possède une capacité à piéger les radicaux libres.

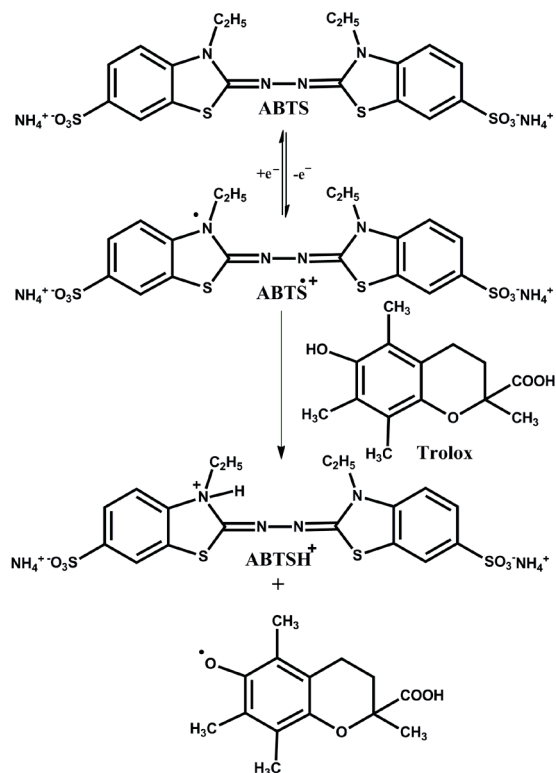


Figure VII.4. Formation et piégeage du radical $ABTS^{\bullet+}$ par un antioxydant donneur de H^{\bullet} (le Trolox®).

La Figure VII.4 présente le processus de génération du radical cation $ABTS^{\bullet+}$ et sa réaction avec un antioxydant, le Trolox. Le Trolox est un donneur de H^{\bullet} qui piège le radical d'azote de l' $ABTS^{\bullet+}$ conduisant à la formation de l' $ABTSH^{\bullet+}$ et donc à la décoloration de la solution. L'absorbance résiduelle du radical $ABTS^{\bullet+}$ est mesurée entre 730-735 nm après incubation à l'obscurité et à température ambiante. La capacité d'un composé à piéger l' $ABTS^{\bullet+}$ est exprimée par la Capacité Antioxydante en Equivalent Trolox (TEAC) qui correspond à la concentration de Trolox ayant la même activité que le composé testé à une concentration précise. Une valeur élevée de TEAC indique un pouvoir antioxydant important du composé testé. L'avantage de cette méthode est que l' $ABTS^{\bullet+}$ est soluble dans les solvants apolaires et dans l'eau et n'est pas affecté par la force ionique du milieu. Cela permet par conséquent l'évaluation de l'activité antioxydante aussi bien des composés hydrophiles que lipophiles (Apak *et al*, 2007).

VII.1.2.2. Méthodologie

L'ABTS est mélangé à 2,5 mL d'une solution de $K_2S_2O_8$ dans l'eau (2,45 mM) pour obtenir une concentration finale de 7 mM. Le mélange est placé à l'obscurité et à température ambiante pendant 12 à 16 h pour générer le radical cation $ABTS^{+•}$. La solution obtenue présente une couleur bleue caractéristique du radical. Cette solution doit être conservée à l'abri de la lumière et n'est stable que pendant 2 à 3 jours. Un aliquote de la solution d' $ABTS^{+•}$ est dilué dans l'eau pour obtenir une absorbance voisine de 0,75 à 730 nm à température ambiante. Des aliquotes de 10 à 50 μ L de PP dilué dans l'éthanol ou dans des solutions de CDs (α -CD, β -CD, HP- β -CD, RAMEB, CRYSMEB) sont ajoutés à 2 mL de la solution diluée du radical de sorte que la concentration finale en CD soit égale à 10 mM et que les concentrations en PP libres ou dans les complexes d'inclusion soient égales. La concentration finale en éthanol, étant faible, n'affecte pas le milieu réactionnel. La décroissance de l'absorbance à 730 nm est ensuite mesurée après 1 h d'incubation à température ambiante à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible (Perkin Elmer Lambda 2S). L'activité antioxydante (AA%) est évaluée en comparant les absorbances des solutions testées à l'absorbance d'un contrôle contenant 2 mL de la solution diluée d' $ABTS^{+•}$ seul ou en présence de 10 mM de CD suivant l'équation VII.1. Les valeurs de SC_{50} sont calculées. La capacité antioxydante est évaluée par rapport à la concentration de Trolox nécessaire pour piéger 50 % d' $ABTS^{+•}$ exprimée en équivalent de Trolox (μ mol TE/ μ mol).

VII.1.2.3. Résultats et discussion

Cette étude nous permet d'évaluer la capacité de piégeage des radicaux cations libres $ABTS^{+•}$ en déterminant les valeurs de SC_{50} et les valeurs de TEAC (la concentration équivalente de Trolox nécessaire pour piéger 50 % de la quantité initiale du radical). La linéarité entre la quantité de Trolox et la capacité de piégeage du radical libre est établie pour chaque nouvelle solution d' $ABTS^{+•}$ vue la faible stabilité de ce radical. Il a été reporté que le piégeage de l' $ABTS^{+•}$ par le Trolox suit une cinétique monophasique alors que les acides hydroxycinnamiques montrent une cinétique biphasique dont la phase stationnaire nécessite 40 min pour s'achever (Koroleva *et al*, 2014). Par conséquent, nous avons choisi de déterminer la capacité du piégeage de l' $ABTS^{+•}$ après 1 h de réaction entre le radical et les PPs ou leurs complexes d'inclusion. Nous avons commencé par la détermination de l'activité antioxydante

des PPs libres avant de passer à l'évaluation de l'effet de l'encapsulation. La concentration SC_{50} de chaque PP est calculée par régression linéaire et la valeur de TEAC est ensuite déterminée.

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le Tableau VII.2 en comparaison avec la littérature. La capacité antioxydante d'un composé est d'autant plus importante que sa SC_{50} est faible et que son TEAC est élevé.

Tableau VII.2. Les valeurs de SC_{50} et TEAC des PPs et du Trolox vis-à-vis de l'ABTS⁺.

Composé	SC_{50} (μ M)	TEAC (μ mol TE/ μ mol)
Trolox	14,79	1
<i>trans</i> -Anéthol	1064	0,014
Estragole	665	0,022
Eugénol	4,75	3,11 (1,68 ^a)
Isoeugénol	4,60	3,22
Acide caféique	6,69	2,21 (2,59 ^b)
Acide <i>p</i> -coumarique	7,10	2,08 (2 ^c , 3,04 ^d)
Acide férulique	5,33	2,77 (3,9 ^d)

^aMerchan Arenas *et al*, 2011 ; ^bOlszewska *et al*, 2012 ; ^cNenadis *et al*, 2004 ; ^dKoroleva *et al*, 2014.

Toute valeur de TEAC supérieure à l'unité montre une activité importante du composé. Nous pouvons remarquer que l'eugénol, l'isoeugénol, l'acide caféique, l'acide *p*-coumarique et l'acide férulique montrent une activité anti-radicalaire 2 à 3,22 fois plus grande que celle du Trolox. L'isoeugénol montre la meilleure efficacité. Nos résultats sont en bon accord avec la littérature (Gomez-Ruiz *et al*, 2007 ; Gulcin, 2011 ; Koroleva *et al*, 2014 ; Nenadis *et al*, 2004 ; Nenadis *et al*, 2007 ; Yeh & Yen, 2003). Il a été démontré que la *para*-substitution des phénols augmente leur capacité à piéger l'ABTS⁺ (Campos & Lissi, 1997). Cela peut certainement expliquer la forte activité antioxydante de ces cinq PPs. De plus, l'acide *p*-coumarique, ayant montré une capacité anti-DPPH[•] relativement faible, possède une efficacité comparable à celle de l'acide caféique pour le piégeage de l'ABTS⁺, ce qui confirme les résultats de Nenadis *et al* (2004). En effet, le mécanisme de réduction et de piégeage d'un radical libre est déterminé non seulement par la structure et la solubilité de l'antioxydant mais également par la nature du solvant (Miguel, 2010). Le solvant influence considérablement l'énergie de dissociation des liaisons intramoléculaires et le potentiel d'ionisation d'un composé.

Le *trans*-anéthol et l'estragole ont montré une faible capacité de piégeage du radical cation ABTS^{•+} par rapport aux autres PPs. Cela est en bon accord avec les résultats obtenus par le test de piégeage du DPPH[•] et est dû au fait que ces deux isomères renferment dans leur structure un groupement méthoxy au lieu d'un hydroxyle et ne possèdent donc pas la capacité de donner un hydrogène pour piéger le radical libre. La capacité des PPs à piéger le radical cation ABTS^{•+} est plus importante que celle du piégeage du radical neutre DPPH[•]. Wintola et Afolayan (2011) ont obtenu des résultats similaires en testant les activités anti-radicalaires d'extraits de plantes. Il apparaît que, suite à la déprotonation du noyau phénol, l'ion phénolate formé est capable de donner un électron au cation ABTS^{•+}, le stabiliser davantage, et augmenter ainsi l'activité antioxydante du produit testé. Il a été démontré que la déprotonation augmente la capacité de transférer un électron au radical (Prior *et al*, 2005). Cela peut également expliquer la faible activité du *trans*-anéthol et de l'estragole qui ont une très faible capacité de se déprotoner. Il a été démontré que le piégeage du radical cation ABTS^{•+} par les acides hydroxycinnamiques et hydroxybenzoïques se faisait généralement selon un mécanisme séquentiel impliquant la perte d'un proton et le transfert d'un électron (*sequential proton loss and electron transfer*, SPLET) pouvant être illustré comme suit (Koroleva *et al*, 2014) :



Dans la suite de ce travail nous avons voulu montré l'effet de la complexation sur la capacité des PPs à piéger le radical cation ABTS^{•+}. Les valeurs de TEAC (μM Trolox) des PPs à une concentration de 1 ppm (eugénol, isoeugénol, acide caféique, acide *p*-coumarique et acide férulique) ou 10 ppm (*trans*-anéthol et estragole), en absence ou présence de CD, sont illustrées dans la Figure VII.5.

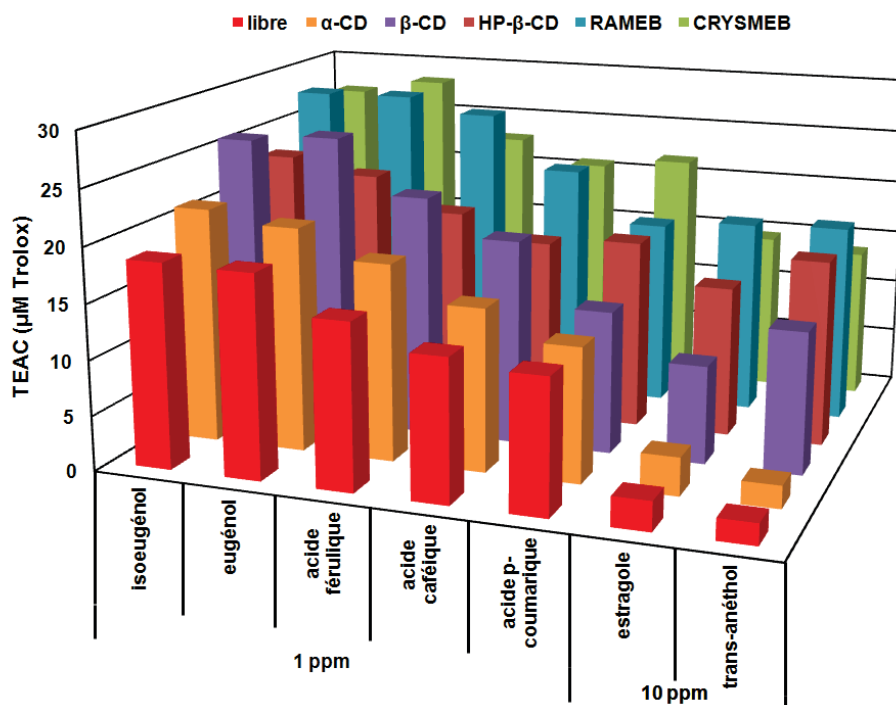


Figure VII.5. Histogramme montrant l'activité antioxydante des PPs libres ou encapsulés exprimée en TEAC (μM Trolox).

Il faut noter qu'en présence de CD seule, une diminution de l'absorbance de la solution d'ABTS^{•+} est observée. Cela peut être expliqué par l'encapsulation du radical dans la CD. Des observations similaires sont reportées dans la littérature (Lucas-Abellan *et al*, 2011). Nos résultats montrent que l'encapsulation par les cinq CDs augmente entre 1,2 à 10 fois les valeurs de TEAC des PPs et donc leur pouvoir antioxydant. L'effet le plus marqué est observé dans le cas du *trans*-anéthol et de l'estragole qui montrent les plus faibles activités antioxydantes à l'état libre. Cette augmentation de la capacité de piégeage du radical ABTS^{•+} en présence de CD peut être due à la formation de complexes d'inclusion avec les PPs. Les interactions entre les PPs et les CDs affaiblissent la liaison covalente entre l'hydrogène et l'oxygène du groupement hydroxyle des PPs facilitant ainsi leur déprotonation (Liu *et al*, 2013). Des résultats similaires sont trouvés dans la littérature (Gharibzahedi *et al*, 2014 ; Lucas-Abellan *et al*, 2011). De plus, les CDs peuvent jouer le rôle d'antioxydants secondaires et agir en synergie avec les PPs

(Lopez-Nicolas *et al*, 2006 ; Lopez-Nicolas *et al*, 2007 ; Lopez-Nicolas *et al*, 2014 ; Nunez-Delicado *et al*, 1997).

Nos résultats montrent que les PP possèdent une capacité importante de piégeage des radicaux libres. Cette capacité est fortement liée à la présence du noyau phénolique et varie selon la nature, le nombre et la position des substituants du cycle aromatique. Les résultats sur le piégeage de l'ABTS⁺⁺ montrent une activité antioxydante des PP encapsulés bien supérieure à celle des PP libres.

VII.2. Etude de l'activité antifongique des PP à l'état libre ou encapsulé

Les études antifongiques ont été menées contre deux champignons phytopathogènes, *F. oxysporum* et *B. cinerea*.

En 2012, la revue "*Molecular Plant Pathology*" a établi un classement des 10 premiers champignons phytopathogènes d'importance économique. *B. cinerea* et *F. oxysporum* sont classés comme deuxième et cinquième champignons phytopathogènes majeurs dans le monde entier, respectivement (Dean *et al*, 2012). Plusieurs espèces de ces deux champignons présentent une résistance contre les différents fongicides actuellement appliqués (Leroch *et al*, 2011). De plus, le traitement répété par des fongicides synthétiques peut provoquer l'apparition davantage de souches résistantes, affecter le sol ainsi que la plante traitée et s'accumuler dans l'environnement, la plante ou le fruit et passer par la suite dans la chaîne alimentaire (Leroux *et al*, 2002). Par conséquent, il est nécessaire de développer de nouvelles formulations alternatives moins toxiques et éco-compatibles aux fongicides de synthèse. Parmi les candidats les plus prometteurs, nous pouvons citer principalement les microorganismes antagonistes et les HEs ou leurs composants (Jacometti *et al*, 2010 ; Ribera & Zuniga, 2012 ; Talibi *et al*, 2014). Les composants des HEs peuvent être directement appliqués comme inhibiteurs des phytopathogènes ou utilisés comme précurseurs pour la synthèse d'agents plus actifs (Bhatti *et al*, 2014). La formulation de ces inhibiteurs fongiques potentiels sous forme de complexes d'inclusion avec les CDs constitue un choix complémentaire pour le développement des alternatives éco-compatibles (Alonso *et al*, 2012). Dans notre travail nous avons évalué l'activité inhibitrice des PP et de leurs complexes d'inclusion sur la croissance mycélienne des champignons et également sur la

germination des spores. Les spores ou les conidies (spores exogènes) sont une forme de résistance ou de survie du champignon (Moore-Landecker, 2001).

La germination des spores constitue la première phase de colonisation d'un nouveau milieu. Les spores peuvent rester dans le sol et aboutir à de nouveaux cycles d'infection des terrains et/ou être disséminées rapidement dans les courants d'air, les éclaboussures d'eau d'arrosage et les semences à des kilomètres du milieu d'émission (Comtois, 2001). Le contrôle des étapes précoces de la germination des spores est donc d'une importance ultime pour une meilleure prévention du risque de contamination fongique.

VII.2.1. Les microorganismes

VII.2.1.1. *Fusarium oxysporum*

F. oxysporum, responsable de la maladie "Fusariose", persiste et se multiplie dans plus de 100 hôtes différentes principalement les grains (blé, orge, maïs, etc.) ou autres (melon, tomate, coton, banane, oignon, etc.) (Michielse & Rep, 2009). Ce champignon peut aussi induire une infection chez l'être humain particulièrement chez les patients immunodéprimés (Nucci & Anaissie, 2007). Certaines espèces peuvent également produire des toxines pour les animaux et même pour l'homme (Cavret & Lecoœur, 2006). L'infection des plantes varie selon les caprices du climat et se développe dans des conditions humides durant 48 à 72 h à des températures variant de 24 à 30 °C. Le spore germe et produit un mycélium sur la plante hôte. Les hyphes formant le mycélium traversent la paroi et infectent la plante. L'infection se déroule en 2 phases : asymptomatique (progression intercellulaire du champignon) et symptomatique (le champignon rejoint les vaisseaux conducteurs du xylème et se développe ainsi dans l'ensemble de la plante). Cela aboutit à des nécroses sur la tige et une décoloration des tissus (Dean *et al*, 2012). L'efficacité des fongicides, généralement appliqués pour contrôler le développement du *Fusarium*, est limitée à quelques souches de ce microorganisme (Swarupa *et al*, 2014). Une infection par *Fusarium* du maïs utilisé pour l'alimentation animale aux États-Unis peut produire une perte annuelle entre 31 et 46 millions de dollars (Wu, 2007). Depuis les années 1990, l'infection du blé et de l'orge par *Fusarium* a engendré une perte de 3 milliards de dollars aux États-Unis (Han *et al*, 2012).

VII.2.1.2. *Botrytis cinerea*

B. cinerea, responsable de la maladie de la "pourriture grise", est un champignon extrêmement polyphage pouvant attaquer environ 230 espèces de plantes cultivées ou sauvages (vigne, tomate, haricot, fraise, kiwi, etc.) (Nakajima & Akutsu, 2014). L'infection peut se dérouler à n'importe quel stade du développement de la plante ainsi qu'en période de stockage. Ce champignon pénètre dans la plante suite à des blessures. Cela permet aux spores de germer ou au mycélium d'envahir et d'infecter rapidement les différentes parties de la plante y compris le fruit (Schumacher & Tudzynski, 2012 ; Williamson *et al*, 2007). Le traitement consiste principalement en un usage répété de fongicides. Le traitement de *B. cinerea* a coûté, par exemple, environ 540 millions d'euros pour l'année 2001 (10% du marché mondial des fongicides) (rapport annuel UIPP, 2002). Les épidémies causées par *B. cinerea* sont initiées surtout par les conidies qui sont présents durant toute la saison. Toutefois, le nombre de conidies est plus important au printemps et en automne quand les conditions climatiques sont plus favorables (Boulard *et al*, 2008 ; Steel *et al*, 2011). Les pertes causées par *B. cinerea* peuvent atteindre 20 % des récoltes mondiales des cultures concernées ce qui correspond environ de 10 à 100 milliards d'euros par an (Genoscope, 2008).

VII.2.2. Procédure microbiologique

VII.2.2.1. Test d'inhibition de la croissance mycélienne

L'activité antifongique est évaluée par la méthode de dilution en milieu solide (Huang *et al*, 2010 ; Quiroga *et al*, 2001). *F. oxysporum* et *B. cinerea* sont maintenus à 23 °C dans des boîtes de Pétri contenant du milieu PDA (*Potato Dextrose Agar*) ou MA2 (*Malt Agar 2%*), respectivement. Le milieu est choisi pour permettre une croissance optimale du champignon. Les milieux sont préparés et stérilisés à l'autoclave à 120 °C pendant 20 min puis refroidis à 50 °C. Pour l'évaluation de la capacité d'inhibition de la croissance mycélienne, des dilutions de PPs libres dans l'éthanol et de leurs complexes d'inclusion sont préparées. Toutes les solutions sont stérilisées par filtration (0,2 µm) avant introduction dans le milieu. Un aliquote de 1 mL de chaque solution est introduit aseptiquement dans 100 mL du milieu de culture (PDA ou MA2 pour *F. oxysporum* et *B. cinerea*, respectivement) avant d'être coulé sous la hotte dans des boîtes de Pétri stériles de 9 cm de diamètre (25 mL/ boîte de Pétri). Les concentrations finales en PPs

sont 37,5 ; 75 ; 150 et 300 µg/mL pour les phénylpropènes (*trans*-anéthol, estragole, eugénol et isoeugénol) et 125 ; 250 ; 500 et 750 µg/mL pour les acides hydroxycinnamiques (acide caféique, acide *p*-coumarique et acide férulique). Des boîtes de Pétri contenant seulement de l'éthanol ou de CD sont utilisées comme témoins et des boîtes ne contenant aucun produit comme contrôle négatif. Les boîtes sont par la suiteensemencées par des inocula de 8 mm de diamètre prélevés à l'emporte-pièce à partir de la périphérie d'un tapis mycélien provenant d'une culture du champignon de 7 jours. Les inocula sont déposés renversés (mycélium en contact avec la gélose) au centre des boîtes. Le diamètre de la croissance radiale du mycélium fongique est mesuré après 7 jours d'incubation à 23 °C. Chaque essai est répété trois fois. Le pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne est exprimé comme suivant :

$$\% \text{ inhibition de croissance} = \frac{(M_t - M)}{M_t} \times 100 \quad \text{VII.4}$$

avec M_t : le diamètre moyen du mycélium du témoin contenant l'éthanol ou la CD; M : le diamètre moyen du mycélium en présence de PP ou de son complexe d'inclusion. Les concentrations inhibitrices IC_{50} et IC_{100} vis-à-vis des 2 champignons sont calculées par régression linéaire. Les IC_{50} et IC_{100} sont les concentrations de PP libre ou dans le complexe d'inclusion nécessaires pour inhiber la croissance du mycélium de 50 % et de 100 % en comparant au témoin, respectivement.

VII.2.2.1. Test d'inhibition de la germination des conidies

La préparation des boîtes et des solutions à tester suit une démarche identique à celle du test d'inhibition de la croissance mycélienne, l'ensemencement des boîtes se faisant par des conidies de *F. oxysporum* récupérés des cultures de 7 jours. Les conidies sont mises en suspension par addition de 3 mL d'eau distillée stérile sur la culture fongique suivie d'une agitation. La concentration en conidies est déterminée à l'aide d'un hémacytomètre. Une dilution de 500 conidies/ mL est préparée. Deux cent µL de cette solution sont ensuite étalés sur les boîtes de Pétri et incubés pendant 3 jours à 23 °C. Chaque essai est répété trois fois. Le nombre total de colonies sur chaque boîte est dénombré et le pourcentage d'inhibition de germination des conidies est exprimé comme suit (Kocić-Tanackov & Dimić, 2013):

$$\% \text{ inhibition de germination} = \frac{(C_t - C)}{C_t} \times 100 \quad \text{VII.5}$$

avec C_t : le nombre moyen de colonies du témoin contenant l'éthanol ou la CD; C : le nombre moyen de colonies en présence du PP ou de son complexe d'inclusion.

Les concentrations inhibitrices IC_{50} et IC_{100} vis-à-vis des deux champignons sont calculées par régression linéaire.

VII.2.3. Résultats et discussion

VII.2.3.1. Test d'inhibition de la croissance mycélienne

L'activité antifongique est évaluée en observant le pouvoir inhibiteur des PPs et de leurs complexes d'inclusion avec l'HP- β -CD à différentes concentrations sur la croissance mycélienne de *F. oxysporum* et de *B. cinerea*. Nous avons choisi l'HP- β -CD pour l'évaluation de l'effet de l'encapsulation car cette CD a montré une capacité importante de solubilisation et de stabilisation des PPs (paragraphe III.4.2). Ce dérivé est cité dans la liste FDA et largement utilisé dans le domaine agroalimentaire et pharmaceutique (Gould & Scott, 2005 ; Kurkov & Loftsson, 2013). De plus, l'HP- β -CD, comme d'autres CDs, est biodégradable et non toxique pour les microorganismes du sol (Fava *et al*, 2002 ; Fenyvesi *et al*, 2005). La solubilité élevée de ce dérivé par rapport à la CD native permet également de travailler dans des domaines de concentrations plus importantes (Kfoury *et al*, 2014). L'effet inhibiteur des PPs libres ainsi que de leurs complexes d'inclusion est évalué par les valeurs d' IC_{50} et d' IC_{100} . Les résultats obtenus pour les deux champignons étudiés sont présentés dans la Figure VII. 6.

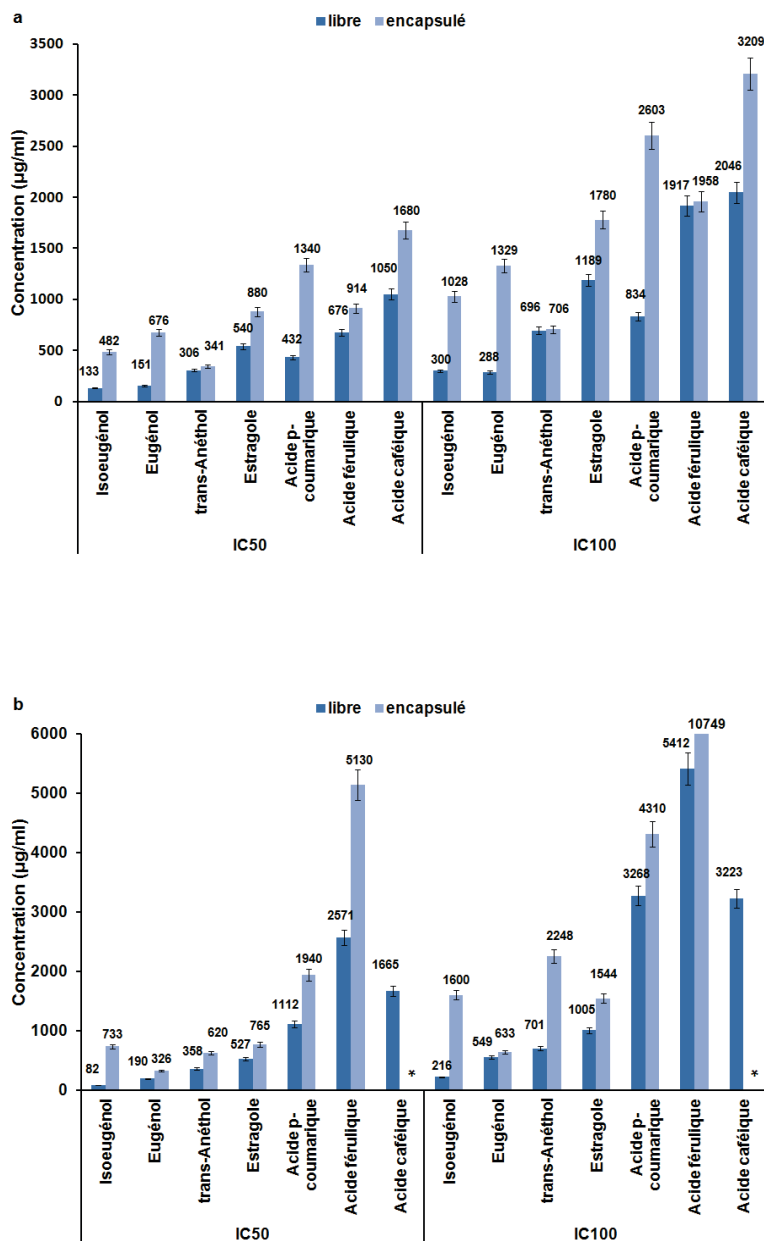


Figure VII. 6. Histogramme montrant les valeurs de IC₅₀ et IC₁₀₀ des PPs et des complexes d'inclusion HP-β-CD/PPs vis-à-vis de a) *F. oxysporum* et b) *B. cinerea*.

Il faut signaler que l'activité inhibitrice de l'acide caféique dans sa forme encapsulée vis-à-vis de *B. cinerea* ne présente pas un effet dose dépendant ; les valeurs de IC₅₀ et IC₁₀₀ ne peuvent donc pas être calculées. En ce qui concerne l'activité des PPs libres, les résultats ont montré que les PPs exercent une activité inhibitrice remarquable contre la croissance mycélienne des deux phytopathogènes. Cette activité est dose dépendante et augmente avec la concentration en PP.

L'exemple de l'activité inhibitrice dose-dépendante de l'isoeugénol contre la croissance mycélienne du *F. oxysporum* est illustré dans la Figure VII.7. Cela nous a permis de calculer les valeurs de IC₅₀ et IC₁₀₀ par régression linéaire (Figure VII.6). Des valeurs similaires sont rapportées dans la littérature (Huang *et al*, 2010 ; Zabka & Pavela, 2013).

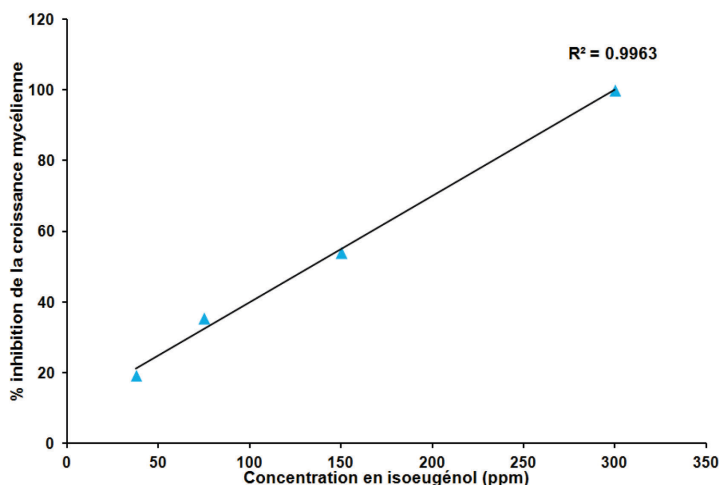


Figure VII. 7. Exemple montrant l'effet inhibiteur de l'isoeugénol sur la croissance mycélienne du *F. oxysporum* d'une manière dose-dépendante.

En consultant la Figure VII.6, nous pouvons remarquer que l'estragole possède une activité similaire contre les deux champignons. *F. oxysporum* se montre plus sensible à l'eugénol, le *trans*-anéthol et les acides hydroxycinnamiques que *B. cinerea* alors que l'isoeugénol est plus actif vis-à-vis de ce dernier. Les phénylpropènes sont plus efficaces que les acides hydroxycinnamiques (acide caféique, acide *p*-coumarique et acide férulique) contre les deux champignons. On peut donc suggérer que ces molécules agissent selon le même mécanisme sur les deux champignons et que l'activité plus importante des phénylpropènes est due à leur caractère hydrophobe. Le caractère hydrophobe est évalué par le paramètre LogP (Tableau III.1). Ce paramètre, reflétant le partage d'une molécule entre un solvant aqueux (eau) et un autre organique (octanol), montre également la répartition des molécules entre la phase aqueuse et la membrane et donc la capacité à déstabiliser cette dernière et induire la mort cellulaire. Nos résultats corroborent ceux d'autres études qui ont montré que le caractère hydrophobe était un facteur important influençant l'activité antimicrobienne des molécules (Ben Arfa *et al*, 2006 ; Dambolena *et al*, 2012 ; Zabka & Pavela, 2013). L'eugénol et l'isoeugénol sont plus actifs que le

trans-anéthol et l'estragole vis-à-vis des deux champignons. Cela est évidemment dû au groupement hydroxyle que l'eugénol et l'isoeugénol renferment sur le noyau aromatique c.-à-d. à la fonction phénolique. Cela montre que l'activité antifongique d'un produit ne peut pas être uniquement attribuée à son caractère hydrophobe mais également à la présence du groupement phénolique. Il a été démontré que les HEs riches en phénols sont plus actifs que les autres HEs (Boulogne *et al*, 2012 ; Marinelli *et al*, 2012 ; Zabka *et al*, 2009). L'activité de l'isoeugénol et du *trans*-anéthol est plus importante que celle de leurs isomères respectifs l'eugénol et l'estragole. Cela peut être expliqué par le fait que la double liaison de la chaîne propényle de l'isoeugénol et du *trans*-anéthol est conjuguée avec le cycle aromatique, ce qui conduit à un système délocalisé d'électrons. Ce système paraît être indispensable pour une meilleure activité antifongique. Nos observations sont cohérentes avec les travaux de la littérature qui ont démontré l'importance de la présence d'un système délocalisé d'électrons pour l'activité antifongique des composés (Ben Arfa *et al*, 2006 ; Rao *et al*, 2010 ; Ultee *et al*, 2002). Nos résultats montrent par conséquent que l'isoeugénol, renfermant un groupement hydroxyle sur un système délocalisé d'électrons, présente la meilleure capacité d'inhibition de la croissance de *F. oxysporum* et *B. cinerea* parmi les PPs étudiés. Des travaux de la littérature ont montré également que l'isoeugénol présentait une meilleure activité antifongique que l'eugénol et d'autres phénols contre différents pathogènes tels que *F. verticillioides* (Dambolena *et al*, 2012), *Phytophthora cactorum* et *Cryphonectria parasitica* (Kim *et al*, 2008). Des auteurs ont également attribué l'activité antimicrobienne des phénols au fait que ces molécules jouent le rôle de transporteur d'un cation monovalent à travers la membrane microbienne (Ultee *et al*, 2002). Le caractère hydrophobe de ces molécules leur permet de traverser les membranes et la résonnance du noyau aromatique facilite la libération de l'hydrogène du groupement hydroxyle.

Le mécanisme d'inhibition de la croissance fongique par les phénols peut être également basé sur l'inactivation des enzymes fongiques renfermant un groupement SH (Cowan, 1999) ainsi que par la fixation sur les groupements amines et hydroxylamines des protéines membranaires. Cela provoque l'altération de la perméabilité de la membrane et la fuite des constituants intracellulaires (Knowles *et al*, 2005 ; Lopez-Malo *et al*, 2005 ; Ultee *et al*, 1999). Les phénols peuvent également s'insérer entre les chaînes d'acides gras et déstabiliser les membranes cellulaires (Bakkali *et al*, 2008). L'activité antifongique des phénols peut être également due à l'inhibition des ATPases de la membrane fongique (Ahmad *et al*, 2010 ;

Sanchez *et al*, 2004). Il a été aussi démontré que l'eugénol (De Oliveira Pereira *et al*, 2013) et l'estragole (Khan *et al*, 2010) peuvent inhiber la synthèse de l'ergostérol et conduire donc à la perte de l'intégralité membranaire.

Les mêmes concentrations de PPs ont été testées sous forme de complexes d'inclusion avec l'HP- β -CD. La Figure VII.8 montre un exemple de différentes boîtes de Pétri inoculées par *F. oxysporum* et traitées par différentes concentrations d'eugénol sous forme libre ou encapsulée après 7 jours d'incubation. Bien que l'encapsulation conserve une activité fongicide de manière dose-dépendante, les PPs sont moins efficaces sous forme encapsulée. Nous pouvons remarquer dans la Figure VII.8 que pour toutes les concentrations testées, une meilleure capacité d'inhibition de la croissance mycélienne est observée dans le cas des PPs libres qu'en présence des complexes d'inclusion. Cela est également révélé par les valeurs de IC₅₀ et IC₁₀₀ des PPs encapsulés qui sont plus élevées que celles des PPs libres vis-à-vis des deux champignons (Figure VII.6).

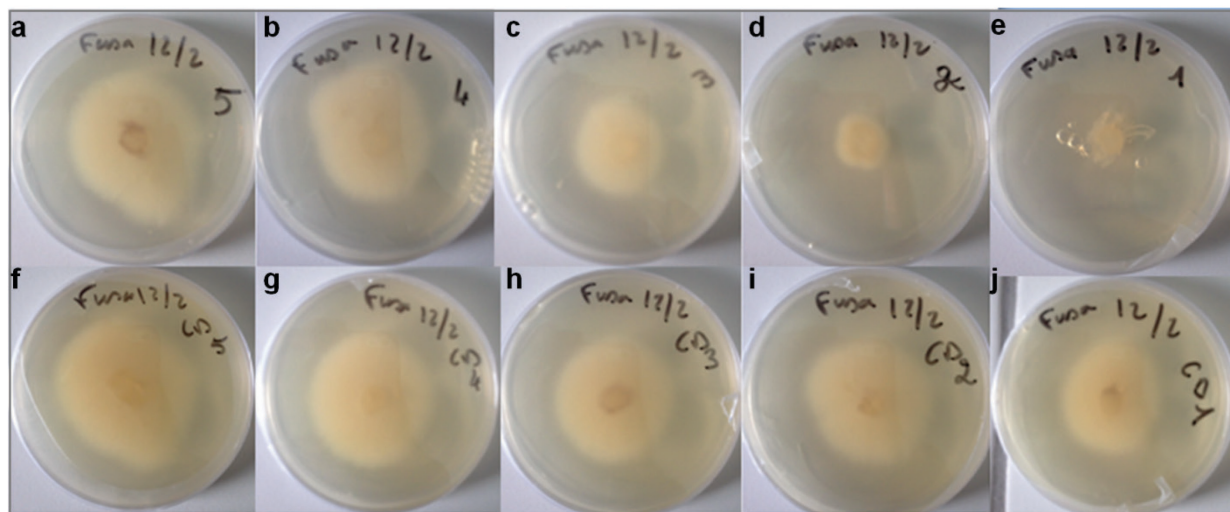


Figure VII.8. Boîtes de Pétri inoculées par *F. oxysporum* et traitées par l'eugénol libre ou encapsulé (après 7 jours d'incubation) : a) et f) étant les témoins sans et avec 10 mM HP- β -CD, respectivement. Concentration en eugénol : b) 37,5 ; c) 75 ; d) 150 et e) 300 μ g/mL d'eugénol libre et g) 37,5 ; h) 75 ; i) 150 et j) 300 μ g/mL d'eugénol encapsulé.

Cela peut être expliqué par le fait que ces champignons produisent des saccharases et des glucanases ou d'autres enzymes extracellulaires qui peuvent dégrader les macrocycles, les polysaccharides et les glycoconjugués (la cellulose, la lignine, les glycoalcaloïdes, les saponines,

etc.) (Christakopoulos *et al*, 1995 ; Quidde *et al*, 1998 ; Rodriguez *et al*, 1996 ; Ruiz-Rubio *et al*, 2001). Ce qui, par conséquent, confère aux champignons, une capacité de dégrader la CD pour libérer le glucose qui sera utilisé comme source d'énergie dans le milieu de culture. Il a été démontré dans la littérature que l'addition du sucre comme par exemple le glucose ou le saccharose stimule la croissance mycélienne de *F. oxysporum* d'une façon dose dépendante (Wang *et al*, 2007). Toutefois, nous pouvons remarquer que l'encapsulation permet la conservation d'une activité antifongique des PPs. La Figure VII.9 montre l'effet des PPs à l'état libre ou encapsulé (testé à la plus grande concentration) sur la croissance mycélienne de *F. oxysporum* et de *B. cinerea*.

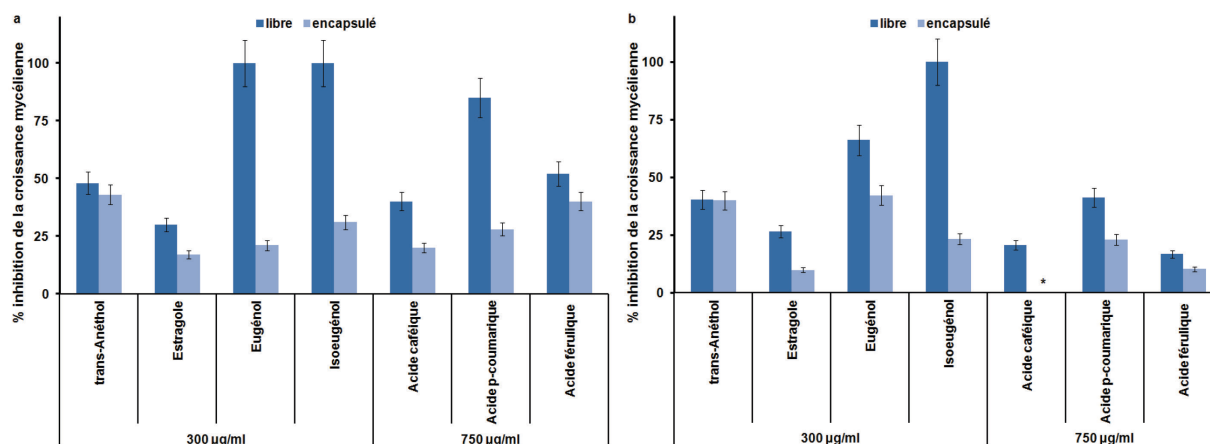


Figure VII.9. Histogramme montrant l'inhibition de la croissance mycélienne de a) *F. oxysporum* et b) *B. cinerea* par les PPs libres ou encapsulés, testés à la plus grande concentration.

VII.2.3.2. Test d'inhibition de la germination des spores

Dans notre travail, nous avons également évalué l'effet des PPs ainsi que de leurs complexes d'inclusion avec l'HP- β -CD sur la germination des spores de *F. oxysporum* et de *B. cinerea*. Ces effets se sont révélés être dose dépendants, ce qui a permis de calculer les valeurs de IC₅₀ et IC₁₀₀ (Figure VII.10).

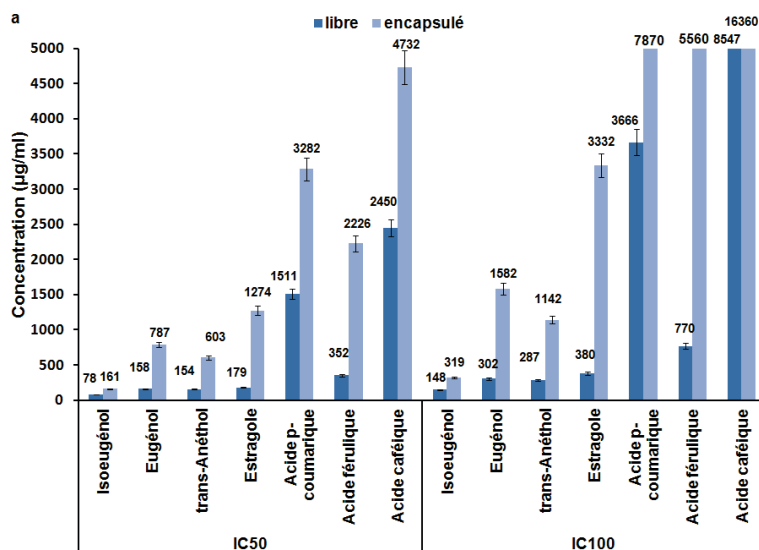


Figure VII.10. Histogramme montrant l'activité inhibitrice des PPs et de leurs complexes avec l'HP-β-CD (exprimée en IC₅₀ et IC₁₀₀) sur la germination des spores de *F. oxysporum*.

D'une façon similaire à celle de l'inhibition de la croissance mycélienne, les phénylpropènes ont montré un effet plus important sur l'inhibition de la germination des spores fongiques que celui des acides hydroxycinnamiques. Nous pouvons remarquer que le stade de sporulation ou de germination est relativement plus sensible aux phénylpropènes que ne l'est la période de la croissance mycélienne (IC₅₀ et IC₁₀₀ d'inhibition de la germination des spores sont inférieures à celles d'inhibition de la croissance mycélienne). L'efficacité d'inhibition de la germination des conidies est pratiquement la même pour les trois phénylpropènes : *trans*-anéthol, estragole et eugénol alors que l'isoeugénol montre la meilleure activité. Cela peut être dû au fait que le caractère hydrophobe des phénylpropènes est plus prononcé que celui des acides hydroxycinnamiques (Tableau III.1). Les spores sont protégées par une enveloppe membranaire (Li *et al*, 2013). La perméabilisation de cette enveloppe inhibe efficacement la germination des spores. Il a été démontré, par exemple, que l'HE de citron (lemongrass) ainsi que son composant majeur, le citral, sont capables de perméabiliser l'enveloppe des spores empêchant ainsi le processus de germination (Palhano *et al*, 2004 ; Ramachandran *et al*, 2008). Une autre étude a montré, en utilisant la microscopie à transmission électronique, que le (E)-hex-2-énal, un des composant de l'arôme de fraise, est capable de désorganiser et détruire la barrière membranaire des conidies et aboutir à la lyse cellulaire (Arroyo *et al*, 2007). Li et collègues (2013) ont également démontré, en utilisant la même technique ainsi que la microscopie électronique à balayage, que l'HE de citronnelle aboutit à une altération irréversible de la membrane des

conidies. Nous pouvons supposer que l'activité inhibitrice des PPs testés, et principalement des phénylpropènes sur la germination des spores, est due à leur caractère hydrophobe permettant la perméabilisation de l'enveloppe des conidies. En comparant la capacité d'inhibition des PPs à celle de leurs complexes d'inclusion, nous pouvons remarquer que les PPs sous forme libre montrent une meilleure efficacité. Cela peut s'expliquer également par l'utilisation des CDs en tant qu'une source d'énergie dans ce modèle *in vitro*. En effet, les spores fongiques, bien qu'ils soient métaboliquement inactifs, constituent un réservoir d'enzymes ayant une forte capacité de dégradation ou de bioconversion (Ramachandran *et al*, 2008). Les travaux de Wang et ses collègues (2007) ont montré que l'addition du glucose ou du saccharose dans le milieu de culture augmentait la germination des spores de *F. oxysporum* d'une façon dose dépendante.

En fait, les modèles *in vitro* ne reproduisent pas la complexité du terrain ou d'un modèle *in vivo*. L'environnement biochimique du microorganisme dépend de la composition du milieu de culture. De plus, dans des conditions défavorables (comme le traitement par un inhibiteur de croissance ou de germination des spores) les microorganismes ont tendance à développer une résistance et adapter leurs métabolismes en fonction des nutriments disponibles. Ils peuvent également mettre en jeu des processus moléculaires et physiologiques n'existant pas en conditions favorables, parmi lesquels la synthèse de protéines cellulaires telles que les enzymes. Cela permet aux champignons d'utiliser des molécules complexes comme les CDs comme source d'énergie. Il faut noter que la dégradation de CD libère des molécules de glucose, source principale d'énergie, qui peut stimuler la croissance et la germination des spores fongiques (Wang *et al*, 2007).

Nos résultats montrent que les PPs pourraient être efficacement utilisés soit comme curatifs (inhibiteurs de la croissance mycélienne) soit comme préventifs (inhibiteurs de la germination de spores) contre les champignons phytopathogènes. De plus, les CDs pourraient représenter un vecteur écologique pour des formulations non toxiques et biodégradables pour l'utilisation sur le terrain en tant que fongicides ou dans les emballages alimentaires comme conservateurs. Comme la plupart de CDs et des PPs sont GRAS, les complexes d'inclusion CD/PP peuvent constituer une alternative éco-compatible pour la lutte contre les champignons phytopathogènes.

VII.3. Etude de l'activité antibactérienne des PPs libres ou encapsulés

L'intoxication alimentaire est un grand problème de santé publique (Akhtar *et al*, 2014). Les principaux modes de transmission des infections à l'homme sont la consommation d'aliments contaminés surtout la viande crue ou mal cuite, les produits laitiers non pasteurisés, l'eau contaminée, les légumes et les fruits mal lavés ainsi que la transmission à partir des personnes infectées et le contact direct avec les animaux (Ferens & Hovde, 2011). Concernant la viande, les pathogènes sont présents généralement dans le tube digestif des bovins et sur leur peau. Par conséquent, la contamination de la viande peut s'installer durant l'abattage et l'élaboration du produit alimentaire. Des mesures de surveillance et de prévention doivent être prises au niveau de la production, la distribution et la conservation des aliments pour contrôler et limiter la propagation de l'infection ainsi que le portage sain chez les animaux. L'hygiène et le bien-être des animaux doivent être également respectés. La désinfection de l'eau et de l'alimentation animale au niveau des élevages est une étape nécessaire pour éliminer le pathogène (Jackson *et al*, 2000). Les HEs ou leurs composants peuvent remplacer les désinfectants couramment utilisés (le chlore, la chloramine, l'ozone et le dioxyde de chlore) dans ce secteur (Komiazyk *et al*, 2014 ; Nazzaro *et al*, 2013) et constituer une alternative efficace pour le contrôle des bactéries et principalement des formes résistantes aux antibiotiques (Franz *et al*, 2010). Les HEs peuvent également réduire la production du méthane par les ruminants et par conséquent la pollution atmosphérique (Benchaar *et al*, 2008 ; Reddy & Krishna, 2009). Les complexes d'inclusion avec les CDs permettent de transformer la forme huileuse des HEs en poudre (Marques, 2010). Cela permet de faciliter leur formulation et dosage et également d'améliorer leur dissolution dans les eaux des abreuvoirs. De plus, la dissémination des HEs sous forme de complexes d'inclusion dans la nourriture animale réduit les pertes par évaporation. La supplémentation de l'alimentation animale avec la CD peut en outre conduire à la production d'aliments ayant une faible teneur en cholestérol (Park *et al*, 2005)

VII.3.1. *Escherichia coli*

E. coli appartient à la famille Enterobacteriaceae (bactéries qui colonisent le tractus intestinal des êtres humains et de tous les animaux à sang chaud). Les *E. coli* sont des bacilles Gram(-), aéro-anaérobies facultatifs et oxydase négative (Croxen *et al*, 2013). *E. coli* est l'une des bactéries les plus souvent mises en cause dans les intoxications alimentaires (Akhtar *et al*, 2014).

Les souches pathogènes d'*E. coli* comme par exemple *E. coli* O157:H7, une forme mutante toxigène, entraînent généralement des troubles digestifs mais également une fièvre, des diarrhées sanglantes graves et des crampes abdominales. L'infection peut aussi aboutir à la destruction des globules rouges et à une insuffisance rénale, caractéristiques du syndrome hémolytique et urémique (SHU) (Allocati *et al*, 2013). Le nombre annuel d'infections par *E. coli* O157:H7 aux États-Unis est estimé à 73 000 cas (Frenzen *et al*, 2005). Environ 60 personnes meurent parmi les 2 100 cas hospitalisés à cause des complications de l'infection. Le coût annuel des infections par *E. coli* O157:H7 aux États-Unis est estimé à 405 millions de dollars (Frenzen *et al*, 2005). En 2004, 2 771, 795 et 702 cas d'infections ont été enregistrés au Japon, en Allemagne et en Angleterre, respectivement (European Food Safety Authority, 2004). Les producteurs individuels de bœuf dépensent 2 à 3 millions de dollars par an pour prévenir la contamination de la viande. *E. coli* développe facilement des résistances aux antibiotiques (Allocati *et al*, 2013). L'administration d'antibiotiques chez le bétail augmente également la résistance des bactéries de la microflore intestinale (Burow *et al*, 2014). Les HEs ou leurs composants ont montré un pouvoir antibactérien remarquable contre *E. coli*, en particulier ses souches résistantes (Al-Mariri & Safi, 2014 ; Benchaar *et al*, 2008 ; Saxena *et al*, 2011). Dans l'étude de Hammer et collègues (1999), 52 HEs et extraits de plantes ont été testés sur *E. coli* et d'autres bactéries à Gram-(+) et Gram-(-) ainsi que sur certaines levures. La supplémentation de l'alimentation animale par des HEs limite la propagation des infections pathogènes (Benchaar *et al*, 2008). Il a été démontré que le taux de mortalité d'*E. coli* O157:H7 dans des fèces augmente significativement chez les bovins nourris avec de maïs supplémenté par 0,5 % d'acide *trans*-cinnamique ou d'acide *p*-coumarique par rapport au lot témoin. La présence de 2 à 10 g/kg de ces deux PPs dans l'alimentation des bovins inhibe la survie d'*E. coli* O157:H7 (Berard *et al*, 2009 ; Wells *et al*, 2005). La supplémentation en esculine (membre de la famille des coumarines) de l'alimentation des veaux, infectés expérimentalement, inhibe la survie d'*E. coli* O157 dans le colon (Benchaar *et al*, 2008 ; Duncan *et al*, 2004). Etant d'origine naturelle, l'impact des HEs ou de leurs composants sur l'écosystème ruminal et la toxicité chez les animaux est négligeable (Bento *et al*, 2013).

VII.3.2. Procédure microbiologique

VII.3.2.1. Technique de macrodilution en milieu liquide

Nous avons utilisé la méthode de macrodilution en bouillon nutritif pour la détermination du pouvoir antibactérien des PPs et de leurs complexes d'inclusion. Le milieu est stérilisé à l'autoclave à 120 °C pendant 20 min puis refroidi avant utilisation. Une solution mère de chaque PP à tester est préparée à la concentration de 100 mM dans du DMSO. Une dilution en cascade est effectuée dans du DMSO. Vingt cinq μL de chaque dilution est ensuite placée en contact d'un inoculum bactérien en phase de croissance exponentielle avec une concentration d'environ 10^6 CFU/mL. Le volume final de chaque culture est de 5 mL où la concentration du DMSO ne dépasse pas 0,5 %. La gamme de concentration finale de chaque PP est comprise entre 200 et 1000 μM de chaque PP libre. Dans les mêmes conditions, un tube témoin (0,5 % DMSO) est préparé simultanément. Un contrôle négatif contenant uniquement l'inoculum bactérien est également réalisé pour vérifier que les bactéries sont toujours en phase de croissance. Tous les tubes sont ensuite incubés à 37 °C pendant 18 h. Les suspensions bactériennes sont ensuite récupérées et la lecture des densités optiques (DO) est réalisée à 660 nm. Chaque expérience est répétée au moins six fois. Le pourcentage d'inhibition de la croissance bactérienne pour chaque concentration en PP libre est évalué comme suit :

$$\% \text{ inhibition de croissance} = \frac{(\text{DO}_t - \text{DO})}{\text{DO}_t} \times 100 \quad \text{VII.6}$$

avec DO_t : la densité optique de la culture bactérienne du témoin contenant le DMSO ; DO : la densité optique de la culture bactérienne en présence du PP. Les concentrations inhibitrices IC_{50} et IC_{100} sont calculées par régression linéaire. Les IC_{50} et IC_{100} sont les concentrations de PP libre capables d'entraîner 50 % et 100 % d'inhibition de la croissance bactérienne, respectivement

Ensuite, en se basant sur les valeurs de la teneur en PP dans le complexe d'inclusion, une quantité précise de chaque complexe est dissoute dans du milieu de culture. Les préparations sont ensuite stérilisées par filtration (0,2 μm). Un aliquote de chaque filtrat est ensuite prélevé et mis dans un volume total de 5 mL de culture en présence de 10^6 CFU/mL d'inoculum bactérien de 18 h à 37 °C. La concentration finale de chaque PP encapsulé est égale à sa concentration IC_{50} déterminée à l'état libre. Un tube témoin contenant uniquement l'HP- β -CD à la même concentration que celle utilisée dans le complexe d'inclusion est préparé en parallèle. Tous les

tubes sont ensuite incubés à 37 °C pendant 18 h et la DO est mesurée à 660 nm. Chaque expérience est répétée quatre fois. Le pourcentage d'inhibition de la croissance bactérienne pour les complexes d'inclusion est calculé selon l'équation VII.6.

VII.3.3. Résultats et discussion

VII.3.3.1. Test d'inhibition de la croissance bactérienne

L'étude de l'activité antibactérienne des PPs libres a été réalisée en déterminant leurs concentrations minimales inhibitrices (IC₅₀ et IC₁₀₀) vis-à-vis d'*E. coli*. Aucune activité inhibitrice significative des acides hydroxycinnamiques (acide caféique, acide *p*-coumarique et acide férulique) n'a été mise en évidence dans la gamme de concentration testée. Par contre, les quatre phénylpropènes étudiés (*trans*-anéthol, estragole, eugénol et isoeugénol) ont montré des activités différentes (Tableau VII.3).

Tableau VII.3. Valeurs de IC₅₀ et IC₁₀₀ des PPs vis-à-vis d'*E. coli* (n=6).

Composé	IC ₅₀ (μM)	IC ₁₀₀ (μM)
<i>trans</i> -Anéthol	312±15	549±27
Estragole	340±30	564±50
Eugénol	810±40	1646±81
Isoeugénol	925±75	1570±127

Les quatre PPs en question ont montré une capacité d'inhibition de la croissance d'*E. coli* de façon dose dépendante, en accord avec la littérature (Chun *et al*, 2015 ; Dusan *et al*, 2006 ; Si *et al*, 2006). Les valeurs de IC₅₀ et IC₁₀₀ des deux isomères de chaque couple (*trans*-anéthol/estragole et eugénol/isoeugénol) sont très proches. Au regard de la structure chimique, la position de l'insaturation dans la chaîne propène est la seule différence qui distingue les deux isomères. Ainsi, la position de la double liaison dans la chaîne propène semble ne pas influencer l'activité antibactérienne des phénylpropènes. Le *trans*-anéthol et l'estragole ont montré une activité beaucoup plus élevée que celle exercée par l'eugénol et l'isoeugénol contre *E. coli*. Cette différence suggère que les deux couples d'isomères agissent soit sur des cibles cellulaires distinctes, soit sur les mêmes cibles mais sans présenter la même efficacité. Les différences observées entre les valeurs d'IC₅₀ et IC₁₀₀ déterminées dans ce travail et celles de la littérature peuvent être attribuées à l'utilisation de différentes souches bactériennes ou à l'application de méthodologies distinctes (Das *et al*, 2010 ; Valgas *et al*, 2007). Ces PPs ne diffèrent que par la

présence des groupements fonctionnels substituant le noyau aromatique. Il a été démontré que le groupement phénolique contribue à accroître l'activité des molécules (Ben Arfa *et al*, 2006 ; Ultee *et al*, 2002). Toutefois, les résultats obtenus dans ce travail laissent supposer que le groupement hydroxyle n'est pas la cause majeure de l'activité antibactérienne car l'eugénol et l'isoeugénol sont moins actifs que le *trans*-anéthol et l'estragole. De ce fait, il semble que l'hydrophobicité de ces PPs soit responsable de l'activité antibactérienne observée. En effet, l'hydrophobicité du *trans*-anéthol et de l'estragole, les composés les plus actifs, est plus élevée que celle de l'eugénol et de l'isoeugénol (valeurs de LogP présentées dans le Tableau III.1).

Plusieurs études ont démontré le rôle clé du caractère hydrophobe des composants d'HEs dans l'effet antibactérien (Di Pasqua *et al*, 2007 ; Gill & Holley, 2006 ; Lanciotti *et al*, 2003 ; Nazzaro *et al*, 2013 ; Si *et al*, 2006). Cette hydrophobie facilite leur insertion et leur solubilisation dans la membrane plasmique ce qui aboutit à une perte de l'intégralité de la bicouche lipidique et une modification de sa perméabilité aux ions et autres constituants cellulaires (Carson *et al*, 2002 ; Cox *et al*, 2000 ; Ultee *et al*, 2002). L'altération de la perméabilité membranaire qui en résulte, conduit ainsi à la perte des éléments cytoplasmiques, la lyse et la mort cellulaire (Bouhdid *et al*, 2010 ; Devi *et al*, 2013 ; Imelda *et al*, 2014 ; Razzaghi-Abyaneh *et al*, 2006).

Nous avons ensuite choisi les concentrations IC₅₀ des PPs afin d'étudier, de manière comparative, leur activité à l'état encapsulé. Nous avons tout d'abord vérifié si l'HP- β -CD était douée d'une activité antibactérienne intrinsèque. Les résultats ont montré que la souche bactérienne traitée uniquement par l'HP- β -CD, en absence de PPs, pousse naturellement sans aucune inhibition de croissance. Cette observation concorde avec le fait qu'à de faibles concentrations, les CDs n'interfèrent pas avec les cellules microbiennes et sont considérées comme inertes (Alsarra *et al*, 2010 ; Liang *et al*, 2012 ; Santos *et al*, 2015 ; Szejtli, 1990 ; Wang *et al*, 2011a). C'est donc les PPs qui sont responsables de l'activité anti-*E. coli* à l'état encapsulé.

Les valeurs de pourcentage d'inhibition bactérienne des PPs à l'état libre ou encapsulé sont présentées dans la Figure VII.11. Les complexes d'inclusion se sont montrés actifs vis-à-vis de la croissance d'*E. coli* à la concentration testée. Cependant cette inhibition (comprise entre 21,43 et 28,72 %) est inférieure à celle procurée par les PPs à l'état libre (entre 48,53 et 58,45 %).

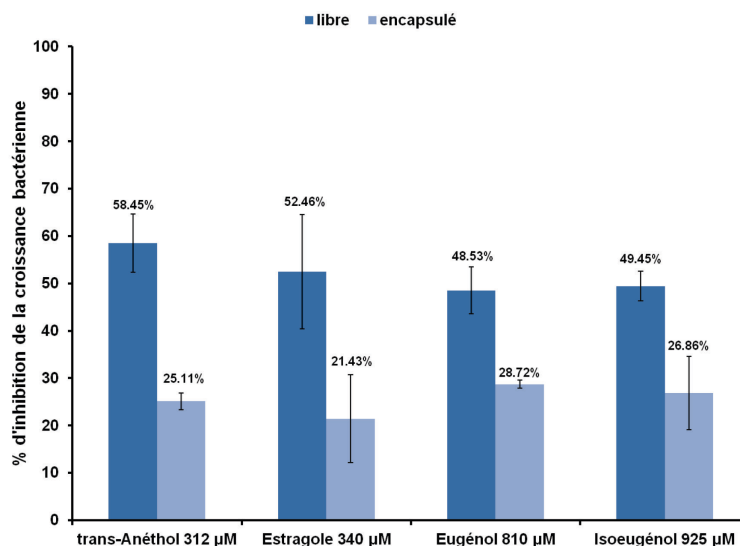


Figure VII. 11. Histogramme d'activité des PPs libres ou encapsulés avec l'HP- β -CD vis-à-vis d'*E. coli* (n=4).

Il convient de noter que la dose-dépendance observée pour les PPs libres, est également démontrée pour ses complexes. La Figure VII.12 montre, à titre d'exemple, l'activité de l'eugénol, libre ou encapsulé, en fonction de sa concentration. La relation concentration-réponse d'un principe actif est indispensable pour décrire son effet pharmacologique ainsi que pour comparer les molécules entre elles.

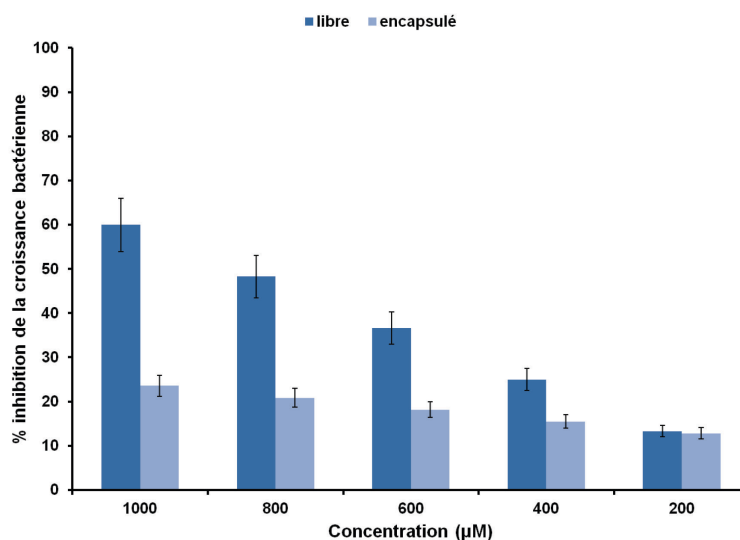


Figure VII. 12. Histogramme d'activité de l'eugénol libre ($r^2 = 0.9896$) ou encapsulé avec l'HP- β -CD ($r^2 = 0.9102$) sur *E. coli* (n=3).

Le fait que les complexes d'inclusion ont montré une activité antibactérienne inférieure à celle des PPs libres pourrait être expliqué par les fonctions physiologiques ou métaboliques de la bactérie. Deux hypothèses peuvent être présentées :

a) L'opéron maltose/maltodextrine est un système crucial chez *E. coli* permettant le transport et l'utilisation des sucres complexes par ce microorganisme. Le gène *malZ* de cet opéron code pour une maltodextrine glucosidase capable de dégrader principalement la γ -CD (MalZ est également dénommée γ -cyclodextrinase) ainsi que les β -CDs en maltose et glucose, indispensable pour la croissance d'*E. coli* sur des milieux riches en maltose ou maltodextrines (Peist *et al.*, 1996 ; Song *et al.*, 2010). Le séquençage du gène *malZ* a démontré que la protéine MalZ présente une homologie structurale avec différentes glucosidases, α -amylases et pullulanases (Schneider *et al.*, 1992). Le gène *malS* de ce même opéron code pour une α -amylase périplasmique capable de dégrader la cycloheptaose (β -CD) (Freundlieb & Boos, 1986 ; Schneider *et al.*, 1992). Cependant, cette α -amylase n'est pas accessible à son substrat à point que ce dernier traverse la membrane externe de la bactérie. De plus, la β -CD ne peut pas diffuser à travers la membrane en utilisant les maltoporines (Dippel & Boos, 2005 ; Freundlieb & Boos, 1986). Il est donc probable que les altérations induites par les PPs au niveau membranaire facilitent la diffusion de l'HP- β -CD à l'intérieur de la cellule bactérienne où elle sera dégradée par les enzymes bactériennes et utilisée comme source de carbone.

b) *E. coli* renferme dans son génome un gène codant pour une protéine NapC homologue à CymA (Gescher *et al.*, 2008). La CymA, une porine spécifique pour la diffusion des CDs à travers la membrane externe, est nécessaire pour la croissance des bactéries sur des milieux contenant l' α -CD et la β -CD comme source de carbone (Pajatsch *et al.*, 1999). Toutefois, la NapC est une protéine périplasmique (Lin *et al.*, 2014) et donc l'altération de la membrane externe bactérienne par les PPs pourrait faciliter la diffusion des CDs à l'intérieur de la cellule bactérienne *via* cette porine.

Ces hypothèses peuvent être confortées par le fait qu'aucune stimulation de la croissance d'*E. coli* en présence d'HP- β -CD seule par rapport au contrôle non traité n'a été observée. Bien qu'il y ait dans la littérature des études montrant une augmentation de l'activité antibactérienne des molécules actives suite à leur encapsulation (Hill *et al.*, 2013 ; Kamimura *et al.*, 2014 ; Liang *et al.*, 2012 ; Tao *et al.*, 2014), il convient de prendre en compte que le résultat divergent obtenu dans ce travail peut s'expliquer par l'utilisation de différentes méthodologies d'évaluation de

l'activité antibactérienne des complexes. En appliquant, par exemple, la méthode de macrodilution en milieu liquide, la CD est plus disponible aux cellules bactériennes contrairement à la méthode par diffusion en milieu gélosé ou autres. De telles discordances pourraient être également attribuées à l'utilisation de différentes souches bactériennes. Par exemple, l'encapsulation dans la β -CD montre une augmentation de l'effet antibactérien de l'acide pipémidique contre *E. coli* et *S. aureus* alors qu'une diminution de cette activité a été observée contre *P. aeruginosa* (Iacovino *et al*, 2013). Les résultats obtenus sont très motivants car ils ouvrent la possibilité de remplacer les antibiotiques de synthèse ayant engendré une résistance chez différentes souches bactériennes par des alternatifs naturels. L'acquisition de la résistance bactérienne aux facteurs de stress externes se fait généralement par la stabilisation et la conservation de la fluidité membranaire. Cela correspond au phénomène appelé « homéoviscosité membranaire » (Denich *et al*, 2003 ; Di Pasqua *et al*, 2007 ; Yuk & Marshall, 2004). Il semble, en se basant sur les résultats de notre étude, que le principal mode d'action des PPs repose sur la déstabilisation et la perte de l'intégrité de la structure membranaire bactérienne.

Ceux-ci pourraient donc être appliqués comme antibiotiques naturels pouvant contourner les mécanismes de résistance bactérienne. Il a été aussi démontré que tout en inhibant sélectivement la croissance des bactéries entériques pathogènes telles que *E. coli*, ces molécules naturelles ne perturbent pas la microflore intestinale (Si *et al*, 2006). Cela encourage davantage l'application de ces produits dans la conservation des produits alimentaires. De plus, nos résultats étayent l'utilisation des CDs comme agents de solubilisation des principes actifs hydrophobes et la substitution des solvants organiques.

VII.4. Conclusion

Les études réalisées dans ce chapitre ont permis d'évaluer *in vitro* la capacité des PPs et leurs complexes d'inclusion à piéger les radicaux libres et inhiber la croissance de certaines espèces fongique et bactérienne. Les résultats ont montré que les PPs exercent un effet antioxydant en neutralisant les radicaux libres ainsi qu'un effet inhibiteur de la croissance et de la germination microbienne. L'encapsulation par les CDs a présenté l'avantage de conserver les activités antioxydante et antimicrobienne des PPs qui semblent être principalement influencées par leur structure et leur caractère hydrophobe. Ces résultats peuvent fournir des informations expliquant l'efficacité et la faisabilité d'utiliser les PPs ainsi que leurs complexes d'inclusion avec les CDs

dans les formulations alimentaires ou pharmaceutiques pour limiter leurs altérations par l'oxydation et inhiber la croissance des contaminants fongiques et bactériens.

Conclusion générale et perspectives

Cette étude s'intègre dans le contexte global de la mise en valeur de nouvelles formulations naturelles et éco-compatibles dans les domaines alimentaire et pharmaceutique.

Les travaux réalisés dans cette thèse ont apporté des résultats encourageants sur l'intérêt des CDs dans les formulations alimentaires ou médicamenteuses des PPs. Le choix de ces PPs (*trans*-anéthole, estragole, eugénol, isoeugénol, acide caféique, acide *p*-coumarique et acide férulique) a été guidé par leur homologie structurale et leurs propriétés biologiques intéressantes.

Dans la première phase de caractérisation physico-chimique des complexes d'inclusion, nous avons montré que les CDs natives et leurs dérivés sont capables d'encapsuler les sept PPs étudiés en solution et à l'état solide. Pour chacun des trente cinq complexes d'inclusion, les paramètres suivants ont été déterminés : constante de stabilité ou de formation (K_f), efficacité de complexation (CE), augmentation de la solubilité, rapport optimal de formulation, augmentation du volume de la formulation, teneur en PP et efficacité d'encapsulation (EE%), indice d'utilité de des CDs, topologie structurale, spectre FTIR et thermogramme DSC. Ces études ont permis d'établir l'existence de complexes d'inclusion stables de stœchiométrie (1:1).

Les CDs ont montré un fort pouvoir complexant et solubilisant des PPs et ont pu être chargées avec une teneur importante de ces derniers. Il s'est avéré que la capacité des CDs d'encapsuler et de solubiliser les PPs est liée à la combinaison de plusieurs paramètres : les propriétés physico-chimiques de la CD et de l'invité ainsi que le rapport molaire de préparation (CD : invité). De façon originale, nous avons observé des corrélations satisfaisantes entre la stabilité du complexe (K_f) et la géométrie de l'invité d'une part ainsi que la stabilité du complexe (K_f) et l'efficacité d'encapsulation d'une autre part. Une corrélation linéaire entre la solubilité intrinsèque de l'invité et la capacité de solubilisation de CDs est également établie. Il en sort par conséquent que, sur le plan physico-chimique, l'encapsulation des PPs est principalement liée à leurs différentes propriétés intrinsèques. Cette étude a également mis en évidence une forte dépendance de la teneur en PP en fonction du rapport molaire durant la préparation des complexes d'inclusion. De ce fait, un compromis entre le rapport molaire de préparation, les caractéristiques du PP et sa teneur dans le complexe doit être trouvé.

Dans la deuxième phase de ce travail, nous avons étudié le comportement des complexes d'inclusion en termes de stabilité et de libération des PPs dans des conditions ambiantes ou sous contraintes de chaleur, d'irradiation et d'humidité. L'encapsulation par les CDs a permis de prolonger efficacement la libération des PPs. Les études de stabilité ont également prouvé que les complexes d'inclusion ralentissent la dégradation des molécules encapsulées. Cela permet d'envisager des systèmes de libération contrôlée ainsi que des systèmes de stockage et de conservation de ces molécules labiles sous réserve que les complexes soient à l'abri de l'humidité.

Dans la troisième phase de cette étude, nous avons évalué, *in vitro*, l'influence de l'encapsulation par les CDs sur les activités antioxydante, antifongique et antibactérienne des PPs. Les résultats ont montré que les CDs conservent ou même améliorent les propriétés étudiées des PPs. Cela a permis de mettre en relief l'importance des CDs dans l'élaboration des alternatives écologiques à l'utilisation des préservatifs et des antimicrobiens de synthèse.

Dans l'ensemble, les résultats de l'étude approfondissent et renforcent nos connaissances sur les systèmes d'encapsulation moléculaires utilisant les CDs en contribuant à élargir l'utilisation des PPs et leurs complexes d'inclusion dans des formulations alimentaires et pharmaceutiques.

Comme perspectives de ce travail, des études supplémentaires visant à confirmer et/ou approfondir certaines hypothèses peuvent être envisagées :

- Nous proposons d'optimiser (solubilisation, protection, libération) davantage les formulations CD/PP ayant montré les résultats les plus intéressants. Il serait envisageable d'enrober les complexes d'inclusion dans des vecteurs lipidiques tels que les liposomes pour améliorer la vectorisation et la libération des PPs.
- Pour étayer l'hypothèse reliant l'effet antibactérien des complexes d'inclusion sur *E. coli* et la perte de l'intégrité membranaire induite par la présence des PPs, nous pourrions suivre l'aspect des membranes bactériennes en microscopie électronique à transmission après exposition aux molécules actives.

- Il serait important d'étudier l'effet de l'association de différents PPs envers les radicaux libres et les souches microbiennes (fongiques et bactériennes) dans le but de trouver d'éventuelle synergie d'action entre ces molécules.
- Les complexes d'inclusion pourraient être incorporés dans des aliments afin d'évaluer l'impact de l'encapsulation sur la préservation des leurs qualités organoleptiques.
- Enfin, des études, *in vivo*, pourraient être envisagées pour confirmer le potentiel des CDs pour la vectorisation, la biodisponibilité des PPs et l'amélioration de leurs propriétés biologiques.

Liste des travaux

Publications

1. M. Kfoury, L. Auezova, S. Fourmentin, H. Greige-Gerges: Investigation of monoterpenes complexation with hydroxypropyl- β -cyclodextrin, *J. Incl. Phenom. Macro. Chem.*, 2014, 1-10.
2. M. Kfoury, L. Auezova, S. Ruellan, H. Greige-Gerges, S. Fourmentin: Cyclodextrin, an efficient tool for *trans*-anethole encapsulation: Chromatographic, spectroscopic, thermal and structural studies, *Food. Chem.*, 2014, 164, 454-461.
3. M. Kfoury, D. Landy, L. Auezova, H. Greige-Gerges, S. Fourmentin: Effect of cyclodextrins complexation on phenylpropanoids solubility and antioxydant activity, *Beilstein J. Org. Chem.* 2014, 10, 2322-2331.
4. M. Kfoury, L. Auezova, S. Ruellan, H. Greige-Gerges, S. Fourmentin: Complexation of, estragole as pure compound and as main component of Basil and Tarragon essential oils with cyclodextrins, *Carbohydr. Polym.* 2015, 118, 156-164
5. M. Kfoury, R. Balan, D. Landy, D. Nistor, S. Fourmentin: Investigation of the complexation of essential oils components with cyclodextrins. *Supramol. Chem.* 2015, 27(9), 620-628.
6. M. Kfoury, L. Auezova, H. Greige-Gerges, S. Fourmentin: Promising applications of cyclodextrins in food: improvement of essential oils retention, controlled release and antiradical activity. *Carbohydr. Polym.* 2015, 131, 264-272.
7. M. Kfoury, A. Lounès-Hadj Sahraoui, N. Bourdon; F. Laruelle; J. Fontaine L. Auezova, H. Greige-Gerges, S. Fourmentin: Solubility, photostability and antifungal activity of phenylpropanoids encapsulated in cyclodextrins. *Food Chem.* 2016. Article in press.

Chapitre d'ouvrage

1. M. Kfoury, A. Ciobanu, N.G. Hadaruga, D.I. Hadaruga, S. Fourmentin: Cyclodextrines comme agents d'emcapsulation des arômes; Dans " Cyclodextrines: Histoire, propriétés et applications. Presses universitaires de Franche-Comté, 2015.

Proceedings

1. M. Kfoury, S. Fourmentin, L. Auezova, H. Greige-Gerges : Effets des substituants d'un phenylpropene sur la stabilité d'encapsulation dans les cyclodextrines, *Leb. Sci. J.* 2015, 16, 107-116.

Communications orales

1. M. Kfoury, L. Auezova, H. Greige, S. Fourmentin : Investigation of anethole and estragole complexation with cyclodextrins, 3rd European Conference on Cyclodextrin (EuroCD2013), Antalya (Turquie), 2-4 Octobre 2013.
2. M. Kfoury, L. Auezova, H. Greige, S. Fourmentin : Effect of cyclodextrins on solubility, stability, controlled release and DPPH[•] scavenging activity of phenylpropanoids, 17th International Cyclodextrin Symposium (ICS17), Sarrebruck (Allemagne), 29-31 Mai 2014.
3. M. Kfoury, A. Lounès-Hadj Sahraoui, N. Bourdon, F. Laruelle, L. Auezova, H. Greige, S. Fourmentin. Antifungal and antioxidant activities of CD/phenylpropanoids inclusion complexes, 16èmes Journées Cyclodextrines (16JCD), Amiens (France), 9-10 Octobre 2014.
4. M. Kfoury, J. Azzi, L. Auezova, H. Greige, S. Fourmentin: Factors controlling complexation of aromas with cyclodextrins: applications in food, The 6th International Conference on Food Chemistry, Engineering & Technology, Timisoara (Romanie), 29-29 Mai 2015.
5. M. Kfoury, L. Auezova, H. Greige, S. Fourmentin: Improvement of essential oils properties by encapsulation in cyclodextrins. EuroCD 2015, Lille (France), 6-9 Octobre 2015.

Communications par affiche

1. M. Kfoury, L. Auezova, H. Greige, I. Mallard, S. Fourmentin : Physicochemical characterization of cyclodextrin/phenylpropenes inclusion complexes. Journée Scientifique à l'Ecole Doctorale des Sciences et Technologie, Beyrouth (Liban), 25 Juin 2013.
2. M. Kfoury, S. Fourmentin, L. Auezova, H. Greige : Effets des substituants sur la stabilité d'encapsulation des phénylpropènes dans les cyclodextrines. Secondes journées Franco-Libanaises, Dunkerque (France), 22-25 Octobre 2013.

3. M. Kfoury, S. Fourmentin, L. Auezova, H. Greige : Cyclodextrins as encapsulation agents for phenylpropanoids in solution and in solid state. 20th LAAS International Science Conference Advanced Research for Better Tomorrow, Hadath (Liban), 27-29 Mars 2014.
4. M. Kfoury, M. Borgie, A. Verdin, F. Ledoux, D. Courcot, L. Auezova, H. Greige, S. Fourmentin: Improvement of phenylpropenes stability and anti-inflammatory effects by encapsulation in hydroxypropyl- β -cyclodextrin. EuroCD 2015, Lille (France), 6-9 Octobre 2015.

Références bibliographiques

- Aburjai, T., Natsheh, F.M. 2003. Plants used in cosmetics. *Phytother. Res.* 17(9), 987–1000.
- Adorjan, B., Buchbauer, G. 2010. Biological properties of essential oils: an updated review. *Flavour Frag. J.* 25(6), 407–426.
- Ahmad, A., Khan, A., Yousuf, S., Khan, L.A., Manzoor, N. 2010. Proton translocating ATPase mediated fungicidal activity of eugenol and thymol. *Fitoterapia.* 81(8), 1157–1162.
- Ajisaka, N., Hara, K., Mikuni, K., Hara, K., Hashimoto, H. 2000. Effects of branched cyclodextrins on the solubility and stability of terpenes. *Biosci. Biotech. Bioch.* 64(4), 731–734.
- Akhtar, S., Sarker, M.R., Hossain, A. 2014. Microbiological food safety: a dilemma of developing societies. *Crit. Rev. Microbiol.* 40(4), 348–359.
- Alcaro, S., Battaglia, D., Ortuso, F. 2003. Docking experiments showing similar recognition patterns of paclitaxel when interacting with different macromolecular targets. *Farmaco.* 58(9), 691–698.
- Alcaro, S., Battaglia, D., Ortuso, F. 2004. Molecular modeling of β -cyclodextrin inclusion complexes with pharmaceutical compounds. *Arkivoc.* 2004(5), 107–117.
- Allocati, N., Masulli, M., Alexeyev, M.F., Di Ilio, C. 2013. *Escherichia coli* in Europe: an overview. *Int. J. Environ. Res. Publ. Health.* 10(12), 6235–5354.
- Al-Mariri, A., Safi, M. 2014. In vitro antibacterial activity of several plant extracts and oils against some gram-negative bacteria. *Iran. J. Med. Sci.* 39(1), 36–43.
- Almenar, E., Auras, R., Wharton, P., Rubino, M., Harte, B. 2007. Release of acetaldehyde from β -cyclodextrins inhibits postharvest decay fungi in vitro. *J. Agr. Food Chem.* 55(17), 7205–7212.
- Alonso, L., Cuesta, P., Fontecha, J., Juarez, M., Gilliland, S.E. 2009. Use of β -cyclodextrin to decrease the level of cholesterol in milk fat. *J. Dairy Sci.* 92(3), 863–869.
- Alonso, M.L., Recio, G., Alonso, R.M., Jimenez, R.M., Laza, J.M., Vilas, J.L., Fañanás, R. 2012. Advantages of biocides: β -cyclodextrin inclusion complexes against active components for pesticide industry. *Int. J. En. An. Ch.* 92(8), 963–978.
- Alsarra, I.A., Alanazi, F.K., Ahmed, S.M., Bosela, A.A., Alhamed, S.S., Mowafy, H.A., Neau, S.H. 2010. Comparative study of itraconazole-cyclodextrin inclusion complex and its commercial product. *Arch. Pharm. Res.* 33(7), 1009–1017.
- Alter, S.R., Brusseau, M.L., Piatt, J.J., Ray-Maitra, A., Wang, J.M., Cain, R.B. 2003. Use of tracer tests to evaluate the impact of enhanced-solubilization flushing on in-situ biodegradation. *J. Contam. Hydrol.* 64(3-4), 191–202.
- Amaral, J.A., Ekins, A., Richards, S.R., Knowles, R. 1998. Effect of selected monoterpenes on methane oxidation, denitrification, and aerobic metabolism by bacteria in pure culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(2), 520–525.
- Ammayappan, L., Jeyakodi Moses, J. 2009. An overview on application of cyclodextrins in textile product enhancement. *J. Textile Assoc.* 70(1), 9–18.
- Amorati, R., Foti, M.C., Valgimigli, L. 2013. Antioxidant activity of essential oils. *J. Agric. Food Chem.* 61(46), 10835–10847.
- Anamura, S., Dohi, T., Shirakawa, M., Okamoto, H., Tsujimoto, A. 1988. Effects of phenolic dental medicaments on prostaglandin synthesis by microsomes of bovine tooth pulp and rabbit kidney medulla. *Arch. Oral Biol.* 33(8), 555–560.
- Anantharaman, A., Subramanian, B., Chandrasekaran, R., Seenivasan, R., Siva, R. 2014. Colorants and cancer: a review. *Ind. Crops Prod.* 53, 167–186.
- Anselmi, C., Centini, M., Maggiore, M., Gaggelli, N., Andreassi, M., Buonocore, A., Beretta, G., Facino, R.M. 2008. Non-covalent inclusion of ferulic acid with α -cyclodextrin improves photo-stability and delivery: NMR and modeling studies. *J. Pharmaceut. Biomed.* 46(4), 645–652.
- Antlsperger, G., Schmid, G. 1996. Toxicological comparison of cyclodextrins. In *Proceedings of the eighth international symposium on cyclodextrins*, edited by J. Szejtli and L. Szenté, 149–155.

- Apak, R., Guclu, K., Demirata, B., Ozyurek, M., Celik, S.E., Bektasoglu, B., Berker, K.I., Özyurt, D. 2007. Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules*. 12(7), 1496–1547.
- Arroyo, F.T., Moreno, J., Daza, P., Boianova, L., Romero, F. 2007. Antifungal activity of strawberry fruit volatile compounds against *Colletotrichum acutatum*. *J. Agr. Food Chem.* 55(14), 5701–5707.
- Arvanitoyannis, I.S., Stratakis, A.C. 2012. Application of modified atmosphere packaging and active/smart technologies to red meat and poultry: a review. *Food Bioprocess Tech.* 5(5), 1423–1446.
- Astray, G., Gonzalez-Barreiro, C., Mejuto, J.C., Rial-Otero, R., Simal-Gandara, J. 2009. A review on the use of cyclodextrins in foods. *Food Hydrocolloid*. 23(7), 1631–1640.
- Astray, G., Mejuto, J.C., Morales, J., Rial-Otero, R., Simal-Gandara, J. 2010. Factors controlling flavors binding constants to cyclodextrins and their applications in foods. *Food Res. Int.* 43(4), 1212–1218.
- Ayala-Zavala, J.F., Soto-Valdez, H., Gonzalez-Leon, A., Alvarez-Parrilla, E., Martin-Belloso, O., Gonzalez-Aguilar, G.A. 2008. Microencapsulation of cinnamon leaf (*Cinnamomum zeylanicum*) and garlic (*Allium sativum*) oils in β -cyclodextrin. *J. Incl. Phenom. Macro.* 60(3-4), 359–368.
- Badr-Eldin, S.M., Elkheshen, S.A., Ghorab, M.M. 2008. Inclusion complexes of tadalafil with natural and chemically modified β -cyclodextrins. I: preparation and in-vitro evaluation. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 70(3), 819–827.
- Bakierowska, A.M., Trzeczynski, J. 2004. Dependence of the water/gas partition coefficient of volatile organic compounds on the ionic strength of sodium chloride solution. *J. Solution Chem.* 33(4), 327–336.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M. 2008. Biological effects of essential oils - a review. *Food Chem. Toxicol.* 46(2), 446–475.
- Bar, R., Ulitzur, S. 1994. Bacterial toxicity of cyclodextrins: luminous *Escherichia coli* as a model. *Appl. Microbiol. Biot.* 41(5), 574–577.
- Baucher, M., Monties, B., Van Montagu, M., Boerjan, W. 1998. Biosynthesis and genetic engineering of lignin. *Crit. Rev. Plant Sci.* 17(2), 125–197.
- Ben Arfa, A., Combes, S., Preziosi-Belloy, L., Gontard, N., Chalier, P. 2006. Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. *Lett. Appl. Microbiol.* 43(2), 149–154.
- Benchaar, C., Calsamiglia, S., Chaves, A.V., Fraser, G.R., Colombatto, D., McAllister, T.A., Beauchemin, K.A. 2008. A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. *Anim. Feed Sci. Tech.* 145(1-4), 209–228.
- Benesi, H.A., Hildebrand, J.H. 1949. A spectrophotometric investigation of the interaction of iodine with aromatic hydrocarbons. *J. Am. Chem. Soc.* 71(8), 2703–2707.
- Bento, M.H.L., Ouwehand, A.C., Tihihonen, K., Lahtinen, S., Nurminen, P., Saarinen, M.T., Schulze, H., Mygind, T., Fischer, J. 2013. Essential oils and their use in animal feeds for monogastric animals-effects on feed quality, gut microbiota, growth performance and food safety: a review. *Vet. Med-CZECH.* 58(9), 449–558.
- Berard, N.C., Holley, R.A., McAllister, T.A., Ominski, K.H., Wittenberg, K.M., Bouchard, K.S., Bouchard, J.J., Krause, D.O. 2009. Potential to reduce *Escherichia coli* shedding in cattle feces by using sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) forage, tested in vitro and in vivo. *Appl. Environ. Microb.* 75(4), 1074–1079.
- Berthelot, K., Estevez, Y., Deffieux, A., Peruch, F. 2012. Isopentenyl diphosphate isomerase: a checkpoint to isoprenoid biosynthesis. *Biochimie.* 94(8), 1621–1634.
- Bhalla, Y., Gupta, V.K., Jaitak, V. 2013. Anticancer activity of essential oils: a review. *J. Sci. Food. Agric.* 93(15), 3643–3653.
- Bhargava, K., Conti, D.S., da Rocha, S.R.P., Zhang, Y. 2015. Application of an oregano oil nanoemulsion to the control of foodborne bacteria on fresh lettuce. *Food Microbiol.* 47, 69–73.
- Bhatti, H.N., Khan, S.S., Khan, A., Rani, M., Ahmad, V.U., Choudhary, M.I. 2014. Biotransformation of monoterpenoids and their antimicrobial activities. *Phytomedicine.* 21(12), 1597–1626.

- Bilia, A.R., Guccione, C., Isacchi, B., Righeschi, C., Firenzuoli, F., Bergonzi, M.C. 2014. Essential oils loaded in nanosystems: a developing strategy for a successful therapeutic approach. *Evid-Based Compl Alt*. 2014, Article number 651593.
- Blach, P., Fourmentin, S., Landy, D., Cazier, F., Surpateanu, G. 2008. Cyclodextrins: a new efficient absorbent to treat waste gas streams. *Chemosphere*. 70(3), 374–380.
- Botterweck, A.A., Verhagen, H., Goldbohm, R.A., Kleinjans, J., van den Brandt, P.A. 2000. Intake of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene and stomach cancer risk: results from analyses in the Netherlands cohort study. *Food Chem. Toxicol.* (7), 599–605.
- Bouchemal, K., Mazzaferro, S. 2012. How to conduct and interpret ITC experiments accurately for cyclodextrin-guest interactions. *Drug Discov. Today*. 17(11-12), 623–629.
- Bouhdid, S., Abrini, J., Amensour, M., Zhiri, A., Espuny, M.J., Manresa, A. 2010. Functional and ultrastructural changes in *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* cells induced by *Cinnamomum verum* essential oil. *J. Appl. Microbiol.* 109(4), 1139–1149.
- Boulard, T., Chave, M., Fatnassi, H., Poncet, C., Roy, J.C. 2008. *Botrytis cinerea* spore balance of a greenhouse rose crop. *Agr. Forest Meteorol.* 148(3), 504–511.
- Boulmedarat, L., Bochot, A., Lesieur, S., Fattal, E. 2005. Evaluation of buccal methyl- β -cyclodextrin toxicity on human oral epithelial cell culture model. *J. Pharm. Sci.* 94(6), 1300–1309.
- Boulogne, I., Petit, P., Ozier-Lafontaine, H., Desfontaines, L., Loranger-Merciris, G. 2012. Insecticidal and antifungal chemicals produced by plants: a review. *Environ. Chem. Lett.* 10(4), 325–347.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Sci. Technol.* 28(1), 25–30.
- Brewster, M.E., Loftsson, T. 2007. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Adv. Drug Deliver. Rev.* 59(7), 645–666.
- Bryce, R.A., Hillier, I.H. 2014. Quantum chemical approaches: semiempirical molecular orbital and hybrid quantum mechanical/molecular mechanical techniques. *Curr. Pharm. Design.* 20(20), 3293–3302.
- Buchbauer, G., Jirovetz, L. 1994. Aromatherapy - use of fragrances and essential oils as medicaments. *Flavour Frag. J.* 9(5), 217–222.
- Burow, E., Simoneit, C., Tenhagen, B.A., Käsbohrer, A. 2014. Oral antimicrobials increase antimicrobial resistance in porcine *E. Coli* - a systematic review. *Prev. Vet. Med.* 113(4), 364–375.
- Buschmann, H.J., Knittel, D., Schollmeyer, E. 2001. New textile applications of cyclodextrins. *J. Inclusion Phenom.* 40(3), 169–172.
- Buschmann, H.J., Schollmeyer, E. 2002. Applications of cyclodextrins in cosmetic products: a review. *J. Cosmet. Sci.* 53(3), 185–191.
- Caesar, G.V. 1986. Starch and its derivatives, Chap. X, J. A. Radley (Ed.), p. 290, Chapman and Hall, London.
- Cai, W.S., Wang, T., Liu, Y.Z., Liu, P., Chipot, C., Shao, X.G. 2011. Free energy calculations for cyclodextrin inclusion complexes. *Curr. Org. Chem.* 15(6), 839–847.
- Caleb, O.J., Opara, U.L., Witthuhn, C.R. 2012. Modified atmosphere packaging of pomegranate fruit and arils: a review. *Food Bioprocess Tech.* 5(1), 15–30.
- Calo, J.R., Crandall, P.G., O'Bryan, C.A., Ricke, S.C. 2015. Essential oils as antimicrobials in food systems - a review. *Food Control.* 54, 111–119.
- Calsamiglia, S., Busquet, M., Cardozo, P.W., Castillejos, L., Ferret, A. 2007. Invited review: essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *J. Dairy Sci.* 90(6), 2580–2595.
- Campos, A.M., Lissi, E.A. 1997. Kinetics of the reaction between 2,2'-azinobis 3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) derived radical cations and phenols. *Int. J. Chem. Kinet.* 29(3), 219–224.
- Caputi, L., Aprea, E. 2011. Use of terpenoids as natural flavouring compounds in food industry. *Recent Pat. Food Nutr. Agric.* 3(1), 9–16.

- Carson, C.F., Mee, B.J., Riley, T.V. 2002. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea Tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrob. Agents Ch.* 46(6), 1914–1920.
- Castro, E.A., Barbiric, D.A.J. 2002. Current theoretical methods applied to study cyclodextrins and their complexes. *J. Argent. Chem. Soc.* 90(4-6), 1-44.
- Castro, E.A., Barbiric, D.A.J. 2006. Molecular modeling and cyclodextrins: a relationship strengthened by complexes. *Curr. Org. Chem.* 10(7), 715–729.
- Castro, H.T., Martinez, J.R., Stashenko, E. 2010. Anethole isomerization and dimerization induced by acid sites or UV irradiation. *Molecules.* 15(7), 5012–5030.
- Carteau, D. Photochimie du *trans*-anéthol. Thèse doctorale. Université Bordeaux I.
- Catherine, A.A., Deepika, H., Negi, P.S. 2012. Antibacterial activity of eugenol and peppermint oil in model food systems. *J. Essent. Oil Res.* 24(5), 481–486.
- Cavallari, C., Abertini, B., Gonzalez-Rodriguez, M.L., Rodriguez, L. 2002. Improved dissolution behaviour of steam-granulated piroxicam. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 54(1), 65–73.
- Cavret, S., Lecoecur, S. 2006. Fusariotoxin transfer in animal. *Food Chem. Toxicol.* 44(3), 444–453.
- Ceborska, M., Asztemborska, M., Lipkowski, J. 2012. Rare ‘head-to-tail’ arrangement of guest molecules in the inclusion complexes of (+)- and (-)-menthol with β -cyclodextrin. *Chem. Phys. Lett.* 553, 64–67.
- Ceborska, M., Asztemborska, M., Luboradzki, R., Lipkowski, J. 2013a. Interactions with β -cyclodextrin as a way for encapsulation and separation of camphene and fenchene. *Carbohydr. Polym.* 91(1), 110–114.
- Ceborska, M., Szwed, K., Suwinska, K. 2013b. β -Cyclodextrin as the suitable molecular container for isopulegol enantiomers. *Carbohydr. Polym.* 97(2), 546–550.
- Challa, R., Ahuja, A., Ali, J., Khar, R.K. 2005. Cyclodextrins in drug delivery: an updated review. *AAPS PharmSciTech.* 6(2), E329–E357.
- Chao, S.C., Gary Young, D., Oberg, C.J. 2000. Screening for inhibitory activity of essential oils on selected bacteria, fungi and viruses. *J. Essent. Oil Res.* 12(5), 639–649.
- Chaumont, J.P., Leger, D. 1989. Propriétés antifongiques de quelques phénols et de composés chimiquement très voisins. Relation structure –activité. *Plant Med. Phyto.* 23(2), 124–126.
- Chemat, F., AbertVian, M., Dangles, O. 2007. Essential oils as antioxidants. *Int. J. Essen. Oil Ther.* 1(1), 4–15.
- Chen, S.J., Wang, M.H., Chen, I.J. 1996. Antiplatelet and calcium inhibitory properties of eugenol and sodium eugenol acetate. *Gen. Pharmacol.* 27(4), 629–633.
- Cheng, S.S., Liu, J.Y., Chang, E.H., Chang, S.T. 2008. Antifungal activity of cinnamaldehyde and eugenol congeners against wood-rot fungi. *Bioresource Technol.* 99(11), 5145–5149.
- Choe, E., Min, D.B. 2006. Mechanisms and factors for edible oil oxidation. *Compr. Rev. Food Sci. F.* 5(4), 169–186.
- Choi, H.G., Lee, B.J., Han, J.H., Lee, M.K., Park, K.M., Yong, C.S., Rhee, J.D., Kim, Y.B., Kim, C.K. 2001. Terfenadine- β -cyclodextrin inclusion complex with antihistaminic activity enhancement. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 27(8), 857–862.
- Choi, M.J., Soottitantawat, A., Nuchuchua, O., Min, S.G., Ruktanonchai, U. 2009. Physical and light oxidative properties of eugenol encapsulated by molecular inclusion and emulsion-diffusion method. *Food Res. Int.* 42(1), 148–156.
- Choi, Y.H., Yang, C.H., Kim, H.W., Jung, S. 2000. Monte Carlo simulations of the chiral recognition of fenoprofen enantiomers by cyclomaltoheptaose (β -cyclodextrin). *Carbohydr. Res.* 328(3), 393–397.
- Christakopoulos, P., Kekos, D., Macris, B.J., Claeyssens, M., Bhat, M.K. 1995. Purification and mode of action of a low molecular mass endo-1,4- β -D-glucanase from *Fusarium oxysporum*. *J. Biotechnol.* 39(1), 85–93.
- Christensson, J.B., Matura, M., Gruvberger, B., Bruze, M., Karlberg, A.T. 2010. Linalool - a significant contact sensitizer after air exposure. *Contact Dermatitis.* 62(1), 32–41.

- Chun, J.Y., Jo, Y.J., Bjrappa, P., Choi, M.J., Min, S.G. 2015. Antimicrobial effect of α - or β -cyclodextrin complexes with trans-cinnamaldehyde against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. Dry. Technol. 33(3), 377–383.
- Churchill, D., Cheung, J.C.F., Park, Y.S., Smith, V.H., VanLoon, G., Buncel, E. 2006. Complexation of diazinon, an organophosphorus pesticide, with α -, β -, and γ -cyclodextrin - NMR and computational studies. Can. J. Chem. 84(4), 702–708.
- Ciobanu, A., Landy, D., Fourmentin, S. 2013a. Complexation efficiency of cyclodextrins for volatile flavor compounds. Food Res. Int. 53(1), 110–114.
- Ciobanu, A., Mallard, I., Landy, D., Brabie, G., Nistor, D., Fourmentin, S. 2013b. Retention of aroma compounds from *Mentha piperita* essential oil by cyclodextrins and crosslinked cyclodextrin polymers. Food Chem. 138(1), 291–297.
- Ciobanu, A., Mallard, I., Landy, D., Brabie, G., Nistor, D., Fourmentin, S. 2012. Inclusion interactions of cyclodextrins and crosslinked cyclodextrin polymers with linalool and camphor in *Lavandula Angustifolia* essential oil. Carbohydr. Polym. 87(3), 1963–1970.
- Comtois, P. 2001. John tyndall and the floating matter of the air. Aerobiologia. 17(3), 193–202.
- Conner, D.E., Beuchat, L.R. 1984. Effects of essential oils from plants on growth of food spoilage yeasts. J. Food Sci. 49(2), 429–434.
- Cowan, M.M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. Clin. Microbiol. Rev. 12(4), 564–582.
- Cox, S.D., Mann, C.M., Markham, J.L., Bell, H.C., Gustafson, J.E., Warmington, J.R., Wyllie, S.G. 2000. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree Oil). J. Appl. Microbiol. 88(1), 170–175.
- Cram, D.J., Sho, P., Knobler, C.B., Maverick, E., Trueblood, K.N. 1986. Host-guest complexation. 38. Cryptahemispherands and their complexes. J. Am. Chem. Soc. 108(11), 2989–2998.
- Cramer, F. 1954. Einschlussverbindungen. Springer-Verlag, Berlin.
- Crini, G. 2014. Review: a history of cyclodextrins. Chem. Rev. 114(21), 10940–10975.
- Crini, G., Morcellet, M. 2002. Synthesis and applications of adsorbents containing cyclodextrins. J. Sep. Sci. 25(13), 789–813.
- Croxen, M.A., Law, R.J., Scholz, R., Keeney, K.M., Wlodarska, M., Finlay, B.B. 2013. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. Clin. Microbiol. Rev. 26(4), 822–880.
- Cusson, C. L'aromathérapie et les huiles essentielles. Masso/Reflexo2007. www.massoreflexo.com.
- da Silveira E Sa, R.D.C., Andrade, L.N., De Oliveira, R.D.R.B., De Sousa, D.P. 2014. A review on anti-inflammatory activity of phenylpropanoids found in essential oils. Molecules. 19(2), 1459–1480.
- Daferera, D.J., Ziogas, B.N., Polissiou, M.G. 2000. GC-MS analysis of essential oils from some greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. J. Agric. Food Chem. 48(6), 2576–2581.
- Dambolena, J.S., Lopez, A.G., Meriles, J.M., Rubinstein, H.R., Zygadlo, J.A. 2012. Inhibitory effect of 10 natural phenolic compounds on *Fusarium verticillioides*. A structure-property-activity relationship study. Food Control. 28(1), 163–170.
- Danel, C., Azaroual, N., Chavaria, C., Odou, P., Martel, B., Vaccher, C. 2013. Comparative study of the complex forming ability and enantioselectivity of cyclodextrin polymers by CE and ^1H NMR. Carbohydr. Polym. 92(2), 2282–2292.
- Daruhazi, A.E., Kiss, T., Vecsernyes, M., Szente, L., Szoke, T., Lemberkovics, T. 2013. Investigation of transport of genistein, daidzein and their inclusion complexes prepared with different cyclodextrins on Caco-2 cell line. J. Pharmaceut. Biomed. 84, 112–116.
- Das, K., Tiwari, R.K.S., Shrivastava, D.K. 2010. Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: current methods and future trends. J. Med. Plants Res. 4(2), 104–111.
- Davidson, C.I., Phalen, R.F., Solomon, P.A. 2005. Airborne particulate matter and human health: a review. Aerosol Sci. Tech. 39(8), 737–749.
- Davidson, P.M., Critzer, F.J., Matthew Taylor, T. 2013. Naturally occurring antimicrobials for minimally processed foods. Annu. Rev. Food Sci. Technol. 4(1), 163–190.

- Davis, M.E., Brewster, M.E. 2004. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future. *Nat. Rev. Drug Discov.* 3(12), 1023–1035.
- De Oliveira Pereira, F., Mendes, J.M., De Oliveira Lima, E. 2013. Investigation on mechanism of antifungal activity of eugenol against *Trichophyton rubrum*. *Med. Mycol.* 51(5), 507–513.
- De Souza Siqueira Quintans, J., Menezes, P.P., Santos, M.R.V., Bonjardim, L.R., Almeida, J.R.G.S., Gelain, D.P., Araujo, A.A.D.S., Quintans Jr, L.J. 2013. Improvement of *p*-cymene antinociceptive and anti-inflammatory effects by inclusion in β -cyclodextrin. *Phytomedicine*. 20(5), 436–440.
- Dean, R., Van Kan, J.A.L., Pretorius, Z.A., Hammond-Kosack, K.E., Di Pietro, A., Spanu, P.D., Rudd, J.J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J., Foster, G.D. 2012. The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* 13(4), 414–430.
- Debouzy, J.C., Fauvelle, F., Crouzy, S., Girault, L., Chapron, Y., Goschl, M., Gadelle, A. 1998. Mechanism of α -cyclodextrin induced hemolysis. 2. A study of the factors controlling the association with serine-, ethanolamine-, and choline- phospholipids. *J. Pharm. Sci.* 87(1), 59–66.
- Decock, G., Fourmentin, S., Surpateanu, G.G., Landy, D., Decock, P., Surpateanu, G. 2006. Experimental and theoretical study on the inclusion compounds of aroma components with β -cyclodextrins. *Supramol. Chem.* 18(6), 477–482.
- Decock, G., Landy, D., Surpateanu, G., Fourmentin, S. 2008. Study of the retention of aroma components by cyclodextrins by static headspace gas chromatography. *J. Incl. Phenom. Macro.* 62(3-4), 297–302.
- Del Toro-Sanchez, C.L., Ayala-Zavala, J.F., Machi, L., Santacruz, H., Villegas-Ochoa, M.A., Alvarez-Parrilla, E., Gonzalez-Aguilar, G.A. 2010. Controlled release of antifungal volatiles of thyme essential oil from β -cyclodextrin capsules. *J. Incl. Phenom. Macro.* 67(3), 431–441.
- Del Valle, E.M.M. 2004. Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochem.* 39(9), 1033–1046.
- Demian, B.A. 2000. Correlation of the solubility of several aromatics and terpenes in aqueous hydroxypropyl- β -cyclodextrin with steric and hydrophobicity parameters. *Carbohydr. Res.* 328(4), 635–639.
- Denich, T.J., Beaudette, L.A., Lee, H., Trevors, J.T. 2003. Effect of selected environmental and physico-chemical factors on bacterial cytoplasmic membranes. *J. Microbiol. Meth.* 52(2), 149–182.
- Desai, K.G.H., Park, H.J. 2005. Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Dry. Technol.* 23 (7), 1361–1394.
- Devi, K.P., Sakthivel, R., Nisha, S.A., Suganthy, N., Pandian, S.K. 2013. Eugenol alters the integrity of cell membrane and acts against the nosocomial pathogen proteus mirabilis. *Arch. Pharm. Res.* 36(3), 282–292.
- Di Pasqua, R., Betts, G., Hoskins, N., Edwards, M., Ercolini, D., Mauriello, G. 2007. Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils. *J. Agr. Food Chem.* 55(12), 4863–4870.
- Dippel, R., Boos, W. 2005. The maltodextrin system of *Escherichia coli*: metabolism and transport. *J. Bacteriol.* 187(24), 8322–8331.
- Divakar, S., Maheswaran, M.M. 1997. Structural studies on inclusion compounds of β -cyclodextrin with some substituted phenols. *J. Inclus. Phenom. Mol.* 27(2), 113–126.
- Djedaini, F., Lin, S.Z., Perly, B., Wouessidjewe, D. 1990. High-field nuclear magnetic resonance techniques for the investigation of a β -cyclodextrin:indomethacin inclusion complex. *J. Pharm. Sci.* 79(7), 643–646.
- Domiciano, T.P., Dalalio, M.M.D.O., Silva, E.L., Ritter, A.M.V., Estevao-Silva, C.F., Ramos, F.S., Caparroz-Assef, S.M., Cuman, R.K.N., Bersani-Amado, C.A. 2013. Inhibitory effect of anethole in nonimmune acute inflammation. *N-S Arch. Pharmacol.* 386(4), 331–338.
- Dorman, H.J.D., Deans, S.G. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.* 88(2), 308–316.
- Dos Santos, C., Buera, M.P., Mazzobre, M.F. 2012. Influence of ligand structure and water interactions on the physical properties of β -cyclodextrins complexes. *Food Chem.* 132(4), 2030–2036.
- Dou, J., Li, S., Cheng, L., Ding, A., Liu, X., Yun, Y. 2011. The enhancement of naphthalene degradation in soil by hydroxypropyl- β - cyclodextrin. *Procedia Environ. Sci.* 10, 26–31.

- Douglas, C.J. 1996. Phenylpropanoid metabolism and lignin biosynthesis: from weeds to trees. *Trends Plant Sci.* 1(6), 171–178.
- Duchene, D., Bochot, A., Loftsson, T. 2009. Cyclodextrins and their use in pharmacy and cosmetology. *S.T.P. Pharma Pratiques.* 19(1), 15–27.
- Duchene, D., Ponchel, G., Bochot, A. 2005. New uses of cyclodextrins. *Eur. J. Pharm. Sci.* 25, S1–S2.
- Duchene, D., Vaution, C., Glomot, F. 1986. Cyclodextrins, their value in pharmaceutical technology. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 12(11-13), 2193–2215.
- Duchene, D., Wouessidjewe, D. 1990. Pharmaceutical uses of cyclodextrins and derivatives. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 16(17), 2487–9249.
- Duchene, D., Wouessidjewe, D., Ponchel, G. 1999. Cyclodextrins and carrier systems. *J. Control. Release.* 62(1-2), 263–268.
- Duncan, S.H., McWilliam Leitch, E.C., Stanley, K.N., Richardson, A.J., Laven, R.A., Flint, H.J., Stewart, C.S. 2004. Effects of esculin and esculetin on the survival of *Escherichia coli* 0157 in human faecal slurries, continuous-flow simulations of the rumen and colon and in calves. *Brit. J. Nutr.* 91(5), 749–755.
- Dušan, F., Marián, S., Katarína, D., Dobroslava, B. 2006. Essential oils-their antimicrobial activity against *Escherichia coli* and effect on intestinal cell viability. *Toxicol. in Vitro.* 20(8), 1435–1445.
- Eid, E.E.M., Abdul, A.B., Suliman, F.E.O., Sukari, M.A., Rasedee, A., Fatah, S.S. 2011. Characterization of the inclusion complex of zerumbone with hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Carbohydr. Polym.* 83(4), 1707–1414.
- Ellena, C. 2008. Perfume formulation: words and chats. *Chem. Biodivers.* 5(6), 1147–1153.
- European Food Safety Authority. Trends and sources of zoonotic agents in animals, feeding stuffs, food and man in the European Union and Norway in 2004.
- Fai, P.B., Grant, A., Reid, B.J. 2009. Compatibility of hydroxypropyl- β -cyclodextrin with algal toxicity bioassays. *Environ. Pollut.* 157(1), 135–140.
- Fakayode, S.O., Lowry, M., Fletcher, K.A., Huang, X., Powe, A.M., Warner, I.M. 2007. Cyclodextrins host- guest chemistry in analytical and environmental chemistry. *Curr. Anal. Chem.* 3(3), 171–181.
- Fava, F., Di Gioia, D., Marchetti, L. 1998. Cyclodextrin effects on the ex-situ bioremediation of a chronically polychlorobiphenyl-contaminated soil. *Biotechnol. Bioeng.* 58(4), 345–355.
- Fava, F., Di Gioia, D., Marchetti, L., Fenyvesi, E., Szejtli, J. 2002. Randomly methylated β -cyclodextrins (RAMEB) enhance the aerobic biodegradation of polychlorinated biphenyl in aged-contaminated soils. *J. Inclusion Phenom.* 44(1-4), 417–421.
- Feng, W., Zheng, X. 2007. Essential oils to control *Alternaria alternata* *in vitro* and *in vivo*. *Food Control.* 18(9), 1126–1130.
- Fenyvesi, E., Gruiz, K., Verstichel, S., De Wilde, B., Leitgib, L., Csabai, K., Szaniszló, N. 2005. Biodegradation of cyclodextrins in soil. *Chemosphere.* 60(8), 1001–1008.
- Ferens, W.A., Hovde, C.J. 2011. *Escherichia coli* O157:H7: animal reservoir and sources of human infection. *Foodborne Pathog. Dis.* 8(4), 465–487.
- Fernandes, C.M., Carvalho, R.A., Pereira da Costa, S., Veiga, F.J.B. 2003. Multimodal molecular encapsulation of nicardipine hydrochloride by β -cyclodextrin, hydroxypropyl- β -cyclodextrin and triacetyl- β -cyclodextrin in solution. Structural studies by ^1H NMR and ROESY experiments. *Eur. J. Pharm. Sci.* 18(5), 285–296.
- Fernandes, L.P., Oliveira, W.P., Sztatisz, J., Szilagyi, I.M., Novaak, Cs. 2009. Solid state studies on molecular inclusions of *Lippia sidoides* essential oil obtained by spray drying. *J. Therm. Anal. Calorim.* 95(3), 855–863.
- Ferrer, J.L., Austin, M.B., Stewart Jr., C., Noel, J.P. 2008. Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids. *Plant Physiol. Biochem.* 46(3), 356–370.
- Fisher, P. 2012. What is homeopathy? An introduction. *Front. Biosci.* 4, 1669–1682.
- Fourmentin, S., Ciobanu, A., Landy, D., Wenz, G. 2013. Space filling of β -cyclodextrin and β -cyclodextrin derivatives by volatile hydrophobic guests. *Beilstein J. Org. Chem.* 9, 1185–1191.

- Fourmentin, S., Outirite, M., Blach, P., Landy, D., Ponchel, A., Monflier, E., Surpateanu, G. 2007. Solubilisation of chlorinated solvents by cyclodextrin derivatives. A study by static headspace gas chromatography and molecular modelling. *J. Hazard. Mater.* 141(1), 92–97.
- Frank, D.W., Gray, J.E., Weaver, R.N. 1976. Cyclodextrin nephrosis in the rat. *Am. J. Pathol.* 83(2), 367–382.
- Franz, C., Baser, K.H.C., Windisch, W. 2010. Essential oils and aromatic plants in animal feeding - a european perspective. A review. *Flav. Frag. J.* 25(5), 327–340.
- Franzetti, A., Di Gennaro, P., Bevilacqua, A., Papacchini, M., Bestetti, G. 2006. Environmental features of two commercial surfactants widely used in soil remediation. *Chemosphere.* 62(9), 1474–1480.
- French, D. 1957. The Schardinger dextrans. *Adv. Carbohydr. Chem.* 12, 189–260.
- French, D., Pulley, A.O., Effenberger, J.A., Rougvie, M.A., Abdullah, M. 1965. Studies on the Schardinger dextrans. XII. The molecular size and structure of the δ -, ϵ -, ζ -, and η -dextrans. *Arch. Biochem. Biophys.* 111, 153–160.
- Frenzen, P.D., Drake, A., Angulo, F.J. 2005. Economic cost of illness due to *Escherichia coli* O157 infections in the United States. *J. Food Protect.* 68(12), 2623–2630.
- Freudenberg, K., Cramer, F. 1948. Die Konstitution der Schardinger-Dextrine α , β und γ . *Z. Naturforsch.* 3b, 464.
- Freudenberg, K., Cramer, F., Plieninger, H. 1953. Verfahren zur Herstellung von Einschlussverbindungen physiologisch wirksamer organischer Verbindungen. Knoll A.-G. Chemische Fabriken, Germany, Patent No. 895,769, 5.
- Freudenberg, K., Jacobi, R. 1935. Über Schardinger Dextrine aus Starke. *Liebigs Ann. Chem.* 518, 102–108.
- Freudenberg, K., Meyer-Delius, M. 1938. Über die Schardinger-dextrine ausstarke. *Ber. Chem.* 71, 1596–1600.
- Freudenberg, K., Schaaf, E., Dumpert, G., Ploetz, T. 1939. Neue ansichten über die starke. *Naturwiss* 27, 850–853.
- Freundlieb, S., Boos, W. 1986. Alpha-amylase of *Escherichia coli*, mapping and cloning of the structural gene, *malS*, and identification of its product as a periplasmic protein. *J. Biol. Chem.* 261(6), 2946–2953.
- Friedman, M., Rasooly, R. 2013. Review of the inhibition of biological activities of food-related selected toxins by natural compounds. *Toxins.* 5(4), 743–775.
- Frijlink, H.W., Franssen, E.J.F., Eissens, A.C., Oosting, R., Lerk, C.F., Meijer, D.K.F. 1991. The effects of cyclodextrins on the disposition of intravenously injected drugs in the rat. *Pharmaceut. Res.* 8(3), 380–384.
- Garg, A., Gupta, B., Prakash, R., Singh, S. 2010. Preparation and characterization of hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex of eugenol: differential pulse voltammetry and $^1\text{H-NMR}$. *Chem. Pharm. Bull.* 58(10), 1313–1319.
- Gaysinsky, S., Taylor, T.M., Davidson, P.M., Bruce, B.D., Weiss, J. 2007. Antimicrobial efficacy of eugenol microemulsions in milk against *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7. *J. Food Protect.* 70(11), 2631–2637.
- Gescher, J.S., Cordova, C.D., Spormann, A.M. 2008. Dissimilatory iron reduction in *Escherichia coli*: identification of CymA of *Shewanella oneidensis* and NapC of *E. coli* as ferric reductases. *Mol. Microbiol.* 68(3), 706–719.
- Gharibzahedi, S.M.T., Razavi, S.H., Mousavi, M. 2014. Characterizing the natural canthaxanthin/2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex. *Carbohydr. Polym.* 101(1), 1147–1153.
- Gidwani, B., Vyas, A. 2014. Synthesis, characterization and application of epichlorohydrin- β -cyclodextrin polymer. *Colloid. Surface. B.* 114, 130–137.
- Gill, A.O., Holley, R.A. 2006. Disruption of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus sakei* cellular membranes by plant oil aromatics. *Int. J. Food Microbiol.* 108(1), 1–9.

- Giordano, F., Novak, C., Moyano, J.R. 2001. Thermal analysis of cyclodextrins and their inclusion compounds. *Thermochim. Acta.* 380(2), 123–151.
- Gómez-Ruiz, J.Á., Leake, D.S., Ames, J.M. 2007. *In vitro* antioxidant activity of coffee compounds and their metabolites. *J. Agr. Food Chem.* 55(17), 6962–6969.
- Gornas, P., Neunert, G., Baczynski, K., Polewski, K. 2009. Beta-cyclodextrin complexes with chlorogenic and caffeic acids from coffee brew: spectroscopic, thermodynamic and molecular modelling study. *Food Chem.* 11(1), 190–196.
- Gossett, J.M. 1987. Measurement of Henry's law constants for C1 and C2 chlorinated hydrocarbons. *Environ. Sci. Technol.* 21(2), 202–208.
- Gould, S., Scott, R.C. 2005. 2-Hydroxypropyl-beta-cyclodextrin (HP-Beta-CD): a toxicology review. *Food Chem. Toxicol.* 43(10), 1451–1459.
- Grant, R.L., Yao, C., Gabaldon, D., Acosta, D. 1992. Evaluation of surfactant cytotoxicity potential by primary cultures of ocular tissues: I. Characterization of rabbit corneal epithelial cells and initial injury and delayed toxicity studies. *Toxicology.* 76(2), 153–176.
- Gray, J., Caparros-Ruiz, D., Grotewold, E. 2012. Grass phenylpropanoids: regulate before using! *Plant Science.* 184, 112–120.
- Grillo, R., Silva Melo, N.F., Moraes, C.M., Rosa, A.H., Frutuoso Roveda, J.A., Menezes, C.M.S., Ferreira, E.I., Fraceto, L.F. 2007. Hydroxymethylnitrofurazone:dimethyl- β -cyclodextrin inclusion complex: a physical-chemistry characterization. *J. Biol. Phys.* 33(5-6), 445–453.
- Grohgan, H., Löbmann, K., Priemel, P., Tarp Jensen, K., Graeser, K., Strachan, C., Rades, T. 2013. Amorphous drugs and dosage forms. *J. Drug Deliv. Sci. Tec.* 23(4), 403–418.
- Guimaraes, A.G., Quintans, J.S.S., Quintans-Junior, L.J. 2013. Monoterpenes with analgesic activity - a systematic review. *Phytother. Res.* 27(1), 1–15.
- Guimaraes, A.G., Oliveira, M.A., Alves, R.D.S., Menezes, P.D.P., Serafini, M.R., De Souza Araújo, A.A., Bezerra, D.P., Quintans, L.J. 2015. Encapsulation of carvacrol, a monoterpene present in the essential oil of oregano, with β -cyclodextrin, improves the pharmacological response on cancer pain experimental protocols. *Chem-Biol. Interact.* 227, 69–76.
- Gulcin, I. 2011. Antioxidant activity of eugenol: a structure-activity relationship study. *J. Med. Food.* 14(9), 975–985.
- Gulcin, I. 2012. Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Arch. Toxicol.* 86(3), 345–391.
- Hadaruga, D.I., Hadaruga, N.G., Resiga, D., Pode, V., Dumbrava, D., Lupea, A.X. 2007. Obtaining and characterization of sage (*Salvia sclarea* L.) essential oil / β -cyclodextrin supramolecular system. *Rev. Chim.* 58(6), 566–573.
- Hadaruga, N.G., Hadaruga, D.I., Lupea, A.X., Paunescu, V., Tatu, C. 2005. Bioactive nanoparticles: 7. Essential oil from Apiaceae and Pinaceae family plants/ β -cyclodextrin supramolecular system. *Rev. Chim.* 56(8), 876–882.
- Hammer, K.A., Carson, C.F., Riley, T.V. 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J. Appl. Microbiol.* 86(6), 985–990.
- Han, J., Lakshman, D.K., Galvez, L.C., Mitra, S., Baenziger, P.S., Mitra, A. 2012. Transgenic expression of lactoferrin imparts enhanced resistance to head blight of wheat caused by *Fusarium graminearum*. *BMC Plant Biol.* 12, article 33.
- Harada, A., Takashima, Y., Yamaguchi, H. 2009. Cyclodextrin-based supramolecular polymers. *Chem. Soc. Rev.* 38(4), 875–882.
- Hedges, A.R. 1998. Industrial applications of cyclodextrins. *Chem. Rev.* 98(5), 2035–2044.
- Hernandez-Sanchez, P., Lopez-Miranda, S., Lucas-Abellan, C., Nunez-Delicado, E. 2012. Complexation of eugenol (EG), as main component of clove oil and as pure compound, with β - and HP- β -CDs. *FNS.* 3, 716–723.
- Higuchi, T., Connors, K.A. 1965. Phasesolubility techniques. *Adv. Anal. Chem. Instrum.* 4, 117–212.

- Hill, L.E., Gomes, C., Taylor, T.M. 2013. Characterization of beta-cyclodextrin inclusion complexes containing essential oils (trans-cinnamaldehyde, eugenol, cinnamon bark, and clove bud extracts) for antimicrobial delivery applications. *LWT-Food Sci. Technol.* 51(1), 86–93.
- Ho, B.T., Joyce, D.C., Bhandari, B.R. 2011. Release kinetics of ethylene gas from ethylene- α -cyclodextrin inclusion complexes. *Food Chem.* 129(2), 259–266.
- Horowitz, S. 1999. Aromatherapy: modern applications of essential oils. *Alt. Complement. Ther.* 5(4), 199–203.
- Hougeir, F.G., Kircik, L. 2012. A Review of delivery systems in cosmetics. *Dermatol. Ther.* 25(3), 234–237.
- Hovgaard, L., Brondsted, H. 1995. Dextran hydrogels for colon-specific drug delivery. *J. Control. Release.* 36(1-2), 159–166.
- <http://www.genoscope.cns.fr/spip/-Botrytis-cinerea-.html>
- Hua, S.S., Grosjean, O.K., Baker, J.L. 1999. Inhibition of aflatoxin biosynthesis by phenolic compounds. *Lett. Appl. Microbiol.* 29(5), 289–291.
- Huang, Y., Zhao, J., Zhou, L., Wang, J., Gong, Y., Chen, X., Guo, Z., Wang, Q., Jiang, W. 2010. Antifungal activity of the essential oil of *Illicium verum* fruit and its main component *trans*-anethole. *Molecules.* 15(11), 7558–7569.
- Hundre, S.Y., Karthik, P., Anandharamakrishnan, C. 2015. Effect of whey protein isolate and β -cyclodextrin wall systems on stability of microencapsulated vanillin by spray-freeze drying method. *Food Chem.* 174, 16–24.
- Iacovino, R., Rapuano, F., Caso, J.V., Russo, A., Lavorgna, M., Russo, C., Isidori, M., Russo, L., Malgieri, G., Isernia, C. 2013. β -Cyclodextrin inclusion complex to improve physicochemical properties of pipemidic acid: characterization and bioactivity evaluation. *Int. J. Mol. Sci.* 14(7), 13022–13041.
- Imelda, F., Faridah, D.N., Kusumaningrum, H.D., 2014. Bacterial inhibition and cell leakage by extract of *Polygonum minus* Huds. leaves. *Int. Food Res. J.* 21(2), 553–560.
- Irie, T., Otagiri, M., Sunada, M., Uekama, K., Ohtani, Y., Yamada, Y., Sugiyama, Y. 1982. Cyclodextrin-induced hemolysis and shape changes of human erythrocytes *in vitro*. *J. Pharmacobio-Dynam.* 5(9), 741–744.
- Irie, T., Uekama, K. 1997. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. III. Toxicological issues and safety evaluation. *J. Pharm. Sci.* 86(2), 147–162.
- Jackson, L.A., Keene, W.E., McAnulty, J.M., Alexander, E.R., Diemayer, M., Davis, M.A., Hedberg, K., Boase, J., Barret, T.J., Samadpour, M., Fleming, D.W. 2000. Where's the beef? The role of cross-contamination in 4 chain restaurant-associated outbreaks of *Escherichia coli* O157:H7 in the pacific northwest. *Arch. Intern. Med.* 160(15), 2380–2385.
- Jacometti, M.A., Wratten, S.D., Walter, M. 2010. Review: alternatives to synthetic fungicides for *Botrytis cinerea* management in vineyards. *Aust. J. Grape Wine R.* 16(1), 154–172.
- JadhavAmbadas, S., Kankudte Ashish, D., Wadikar Jagdish, C., Chintale Ashwini, G., Karde Vaibhav, K., Puri Sachin, G. 2013. Liquisolid technique a novel approach to enhance solubility and dissolution rate: a review. *RJPT.* 6(8), 819–824.
- Jarvinen, K., Jarvinen, T., Thompson, D.O., Stella, V.J. 1994. The effect of a modified β -cyclodextrin, SBE4- β -CD, on the aqueous stability and ocular absorption of pilocarpine. *Curr. Eye Res.* 13(12), 897–905.
- Jayashree, T., Subramanyam, C. 1999. Antiaflatoxigenic activity of eugenol is due to inhibition of lipid peroxidation. *Lett. Appl. Microbiol.* 28(3), 179–183.
- Jiang, H., Zhang, S., Shi, Q. 2011. Removal of cholesterol by β -cyclodextrin. *Asian J. Chem.* 23(9), 3783–3786.
- Kalemba, D., Kunicka, A. 2003. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr. Med. Chem.* 10(10), 813–829.

- Kamatou, G.P.P., Vermaak, I., Viljoen, A.M., Lawrence, B.M. 2013. Menthol: a simple monoterpene with remarkable biological properties. *Phytochemistry*. 96, 15–25.
- Kamihira, M., Asai, T., Yamagata, Y., Taniguchi, M., Kobayashi, T. 1990. Formation of inclusion complexes between cyclodextrins and aromatic compounds under pressurized carbon dioxide. *J. Ferment. Bioeng.* 69(6), 350–353.
- Kanaka Durga Devi, N., Prameela Rani, A., Muneer Aved, M., SaiKumar, K., Kaushik, J., Sowjanya, V. 2010. Cyclodextrins in pharmacy - an overview. *Journal of Global Pharma Technology*. 2(11), 1–10.
- Kang, P., Kim, K.Y., Lee, H.S., Min, S.S., Seol, G.H. 2013. Anti-inflammatory effects of anethole in lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. *Life Sci.* 93(24), 955–961.
- Karakhanov, E.A., Maximov, A.L. 2010. Molecular imprinting technique for the design of cyclodextrin based materials and their application in catalysis. *Curr. Org. Chem.* 14(13), 1284–1295.
- Karoyo, A.H., Sidhu, P., Wilson, L.D., Hazendonk, P. 2013. Characterization and dynamic properties for the solid inclusion complexes of β -cyclodextrin and perfluorooctanoic acid. *J. Phys. Chem. B.* 117(27), 8269–8282.
- Kasahara, K., Osawa, C. 1998. Combination effects of spices on masking of odor in boiled sardine. *Fisheries Sci.* 64(3), 415–418.
- Kayaci, F., Uyar, T. 2011. Solid inclusion complexes of vanillin with cyclodextrins: their formation, characterization, and high-temperature stability. *J. Agr. Food Chem.* 59(21), 11772–11778.
- Kfoury, M., Auezova, L., Fourmentin, S., Greige-Gerges, H. 2014. Investigation of monoterpenes complexation with hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* 80, 51–60.
- Kfoury, M., Auezova, L., Greige-Gerges, H., Ruellan, S., Fourmentin, S. 2015. Complexation of estragole as pure compound and as main component of basil and tarragon essential oils with cyclodextrins. *Carbohydr. Polym.* 118, 156–164.
- Khan, A., Ahmad, A., Akhtar, F., Yousuf, S., Xess, I., Khan, L.A., Manzoor, N. 2010. *Ocimum sanctum* essential oil and its active principles exert their antifungal activity by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity. *Res. Microbiol.* 161(10), 816–823.
- Khan, A., Ahmad, A., Akhtar, F., Yousuf, S., Xess, I., Khan, L.A., Manzoor, N. 2011. Induction of oxidative stress as a possible mechanism of the antifungal action of three phenylpropanoids. *FEMS Yeast Res.* 11(1), 114–122.
- Khan, M.S.A., Ahmad, I. 2011. *In vitro* antifungal, anti-elastase and anti-keratinase activity of essential oils of *Cinnamomum*-, *Syzygium*- and *Cymbopogon*-Species against *Aspergillus fumigatus* and *Trichophyton rubrum*. *Phytomedicine*. 19(1), 48–55.
- Kim, H., Jeong, K., Lee, S., Jung, S. 2002. Molecular dynamics simulation of cyclosophoroheptadecaose (Cys-A). *J. Comput. Aid. Mol. Des.* 16(8-9), 601–610.
- Kim, H.P., Son, K.H., Chang, H.W., Kang, S.S. 2004. Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *J. Pharmacol. Sci.* 96(3), 229–245.
- Kim, J., Lee, Y.S., Lee, S.G., Shin, S.C., Park, I.K. 2008. Fumigant antifungal activity of plant essential oils and components from West Indian bay (*Pimenta racemosa*) and thyme (*Thymus vulgaris*) oils against two phytopathogenic fungi. *Flav. Frag. J.* 23(4), 272–277.
- Kimura, T., Fujisawa, M., Nakano, Y., Kamiyama, T., Otsu, T., Maeda, M., Takagi, S. 2007. Calorimetric study on inclusion of some alcohols into α -cyclodextrin cavities: molecular mechanical calculation of hydration gibbs energies. *J. Therm. Anal. Calorim.* 90(2), 581–585.
- Knowles, J.R., Roller, S., Murray, D.B., Naidu, A.S. 2005. Antimicrobial action of carvacrol at different stages of dual-species biofilm development by *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Appl. Environ. Microb.* 71(2), 797–803.
- Kocić-Tanackov, S.D., Dimić, G. R. 2013. Antifungal activity of essential oils in the control of food-borne fungi growth and mycotoxin biosynthesis in food. *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education* (A. Méndez-Vilas, Ed.).
- Koeduka, T., Fridman, E., Gang, D.R., Vassao, D.G., Jackson, B.L., Kish, C.M., Orlova, I., Spassova, S.M., Lewis, N.G., Noel, J.P., Baiga, T.J., Dudareva, N., Pichersky, E. 2006. Eugenol and isoeugenol,

- characteristic aromatic constituents of spices, are biosynthesized via reduction of a coniferyl alcohol ester. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 103(26), 10128–10133.
- Koh, T., Murakami, Y., Tanaka, S., Machino, M., Sakagami, H. 2013. Re-evaluation of anti-inflammatory potential of eugenol in IL-1 β -stimulated gingival fibroblast and pulp cells. *In vivo.* 27(2), 269–273.
- Kolb, B., Ettre, L.S. 2006. Static headspace-gas chromatography: theory and practice, second edition. *Static Headspace-Gas Chromatography: Theory and Practice, Second Edition.*
- Komiazzyk, M., Palczewska, M., Sitkiewicz, I., Groves, P. 2014. Use of plant extracts to control and treat AB5 enterotoxin-related diarrhea. *Pol. J. Microbiol.* 63(1), 3–14.
- Komiyama, M., Bender, M.L. 1978. Thermodynamic studies of the cyclodextrin-accelerated cleavage of phenyl esters. *J. Am. Chem. Soc.* 100(14), 4576–4579.
- Korkina, L., Kostyuk, V., de Luca, C., Pastore, S. 2011. Plant phenylpropanoids as emerging anti-inflammatory agents. *Mini-Rev. Med. Chem.* 11(10), 823–835.
- Korkina, L.G. 2007. Phenylpropanoids as naturally occurring antioxidants: from plant defense to human health. *Cell. Mol. Biol.* 53(1), 15–25.
- Koroleva, O., Torkova, A., Nikolaev, I., Khrameeva, E., Fedorova, T., Tsentalovich, M., Amarowicz, R. 2014. Evaluation of the antiradical properties of phenolic acids. *Int. J. Mol. Sci.* 15(9), 16351–16380.
- Kour, H., Towseef Wani, N.A., Malik, A., Kaul, R., Chauhan, H., Gupta, P., Bhat, A., Singh, J. 2013. Advances in food packaging - a review. *Stewart Posthar. Rev.* 9(4), 1–7a.
- Kumar, S., Bajwa, B.S., Kaur, B., Singh, G., Nandan, D. 2013. Herbal plants as potential anticancer agents: a review. *Res. J. Pharm. Biol. Chem. Sci.* 4(3), 233–251.
- Kunicka-Styczynska, A., Sikora, M., Kalemba, D. 2009. Antimicrobial activity of lavender, tea tree and lemon oils in cosmetic preservative systems. *J. Appl. Microbiol.* 107(6), 1903–1911.
- Kuriata-Adamusiak, R., Strub, D., Lochynski, S. 2012. Application of microorganisms towards synthesis of chiral terpenoid derivatives. *Appl. Microbiol. Biot.* 95(6), 1427–1436.
- Kurita, N., Miyaji, M., Kurane, R., Takahara, Y. 1981. Antifungal activity of components of essential Oils. *Agric. Biol. Chem.* 45(4), 945–952.
- Kurkov, S.V., Loftsson, T. 2013. Cyclodextrins. *Int. J. Pharm.* 453(1), 167–180.
- Kusumawati, I., Indrayanto, G. 2013. Natural antioxidants in cosmetics. *Stud. Nat. Prod. Chem.* 40, 485–505.
- Lanciotti, R., Patrignani, F., Bagnolini, F., Guerzoni, M.E., Gardini, F. 2003. Evaluation of diacetyl antimicrobial activity against *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. *Food Microbiol.* 20(5), 537–543.
- Landry, K.S., Chang, Y., McClements, D.J., McLandsborough, L. 2014. Effectiveness of a novel spontaneous carvacrol nanoemulsion against *Salmonella enterica enteritidis* and *Escherichia coli* O157: H7 on contaminated mung bean and alfalfa seeds. *Int. J. Food Microbiol.* 187, 15–21.
- Landy, D., Fourmentin, S., Salome, M., Surpateanu, G. 2000. Analytical improvement in measuring formation constants of inclusion complexes between β -cyclodextrin and phenolic compounds. *J. Inclusion Phenom.* 38(1-4), 187–198.
- Landy, D., Mallard, I., Ponchel, A., Monflier, E., Fourmentin, S. 2012. Remediation technologies using cyclodextrins: an overview. *Environ. Chem. Lett.* 10(3), 225–237.
- Landy, D., Tetart, F., Truant, E., Blach, P., Fourmentin, S., Surpateanu, G. 2007. Development of a competitive continuous variation plot for the determination of inclusion compounds stoichiometry. *J. Incl. Phenom. Macro.* 57(1-4), 409–413.
- Lang, G., Buchbauer, G. 2012. A review on recent research results (2008-2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. A review. *Flavour Frag. J.* 27(1), 13–39.
- Lawtrakul, L., Inthajak, K., Toochinda, P. 2014. Molecular calculations on β -cyclodextrin inclusion complexes with five essential oil compounds from *Ocimum basilicum* (sweet basil). *ScienceAsia.* 40(2), 145–151.

- Leclercq, L., Nardello-Rataj, V., Rauwel, G., Aubry, J.M. 2010. Structure-activity relationship of cyclodextrin/biocidal double-tailed ammonium surfactant host-guest complexes: towards a delivery molecular mechanism? *Eur. J. Pharm. Sci.* 41(2), 265–275.
- Lee, M.S., Choi, J., Posadzki, P., Ernst, E. 2012. Aromatherapy for health care: an overview of systematic reviews. *Maturitas.* 71(3), 257–260.
- Lehn, J.M. 1985. Supramolecular chemistry: receptors, catalysts, and carriers. *Science.* 227(4689), 849–856.
- Lehn, J.M. 1988. Supramolecular chemistry - scope and perspectives: molecules - supermolecules - molecular devices. *J. Inclusion Phenom.* 6(4), 351–396.
- Leroch, M., Kretschmer, M., Hahn, M. 2011. Fungicide resistance phenotypes of *Botrytis cinerea* isolates from commercial vineyards in South West Germany. *J. Phytopathol.* 159, 63–65.
- Leroux, P., Fritz, R., Debieu, D., Albertini, C., Lanen, C., Bach, J., Gredt, M., Chapeland, F. 2002. Mechanisms of resistance to fungicides in field strains of *Botrytis cinerea*. *Pest Manag. Sci.* 58(9), 876–888.
- Leroy-Lechat, F., Wouessidjewe, D., Andreux, J.P., Puisieux, F., Duchene, D. 1994. Evaluation of the cytotoxicity of cyclodextrins and hydroxypropylated derivatives. *Int. J. Pharm.* 101(1-2), 97–103.
- Li, D., Baert, L., Uyttendaele, M. 2013. Inactivation of food-borne viruses using natural biochemical substances. *Food Microbiol.* 35(1), 1–9.
- Liang, H., Yuan, Q., Vriesekoop, F., Lv, F. 2012. Effects of cyclodextrins on the antimicrobial activity of plant-derived essential oil compounds. *Food Chem.* 135(3), 1020–1027.
- Lin, I.W.S., Lok, C.N., Che, C.M. 2014. Biosynthesis of silver nanoparticles from silver(i) reduction by the periplasmic nitrate reductase c-type cytochrome subunit NapC in a silver-resistant *E. coli*. *Chem. Sci.* 5(8), 3144–3150.
- Lina, B.A.R., Bar, A. 2004. Subchronic oral toxicity studies with α -cyclodextrin in rats. *Regul. Toxicol. Pharm.* 39, S14–S26.
- Lino, A.C.S., Takahata, Y., Jaime, C. 2002. α - and β -cyclodextrin complexes with n-alkyl carboxylic acids and n-alkyl *p*-hydroxy benzoates. A molecular mechanics study of 1:1 and 1:2 associations. *Mol. Struc-Theochem.* 594(3), 207–213.
- Lis-Cieplak, A., Sitkowski, J., Kolodziejski, W. 2014. Comparative proton nuclear magnetic resonance studies of amantadine complexes formed in aqueous solutions with three major cyclodextrins. *J. Pharm. Sci.* 103(1), 274–282.
- Liu, L., Guo, Q.X. 2002. The driving forces in the inclusion complexation of cyclodextrins. *J. Inclusion Phenom.* 42(1-2), 1–14.
- Liu, M., Dong, L., Chen, A., Zheng, Y., Sun, D., Wang, X., Wang, B. 2013. Inclusion complexes of quercetin with three β -cyclodextrins derivatives at physiological pH: spectroscopic study and antioxidant activity. *Spectrochim. Acta A.* 115, 854–860.
- Liu, X., Zhang, X., Chen, W., Gaidau, C.C., Miu, L. 2012. Preparation of a colored β -cyclodextrin fragrance agent for leather finishing. *ICAMS.* 2012, 141–146.
- Liu, Y., Li, L., Zhang, H.Y., Yang, Y.W., Ding, F. 2004. Correlation between thermodynamic behavior and structure in the complexation of modified β -cyclodextrins and bile salts. *Supramol. Chem.* 16(5), 371–379.
- Locci, E., Lai, S., Piras, A., Marongiu, B., Lai, A. 2004. ^{13}C -CPMAS and ^1H -NMR study of the inclusion complexes of β -cyclodextrin with carvacrol, thymol, and eugenol prepared in supercritical carbon dioxide. *Chem. Biodivers.* 1(9), 1354–1366.
- Loftsson, T. 2012. Drug permeation through biomembranes: cyclodextrins and the unstirred water layer. *Pharmazie.* 67(5), 363–370.
- Loftsson, T., Brewster, M.E. 2010. Pharmaceutical applications of cyclodextrins: basic science and product development. *J. Pharm. Pharmacol.* 62(11), 1607–1621.
- Loftsson, T., Brewster, M.E. 2011. Pharmaceutical applications of cyclodextrins: effects on drug permeation through biological membranes. *J. Pharm. Pharmacol.* 63(9), 1119–1135.

- Loftsson, T., Duchene, D. 2007. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. *Int. J. Pharm.* 329(1-2), 1–11.
- Loftsson, T., Jarho, P., Másson, M., Järvinen, T. 2005. Cyclodextrins in drug delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.* 2, 335–351.
- Loftsson, T., Hreinsdottir, D., Masson, M. 2007. The complexation efficiency. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* 57(1-4), 545–552.
- Log P. <http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>.
- Lopez-Malo, A., Palou, E., León-Cruz, R., Alzamora, S.M. 2005. Mixtures of natural and synthetic antifungal agents. *Adv. Exp. Med. Biol.* 571, 261–286.
- Lopez-Nicolas, J.M., Nunez-Delicado, E., Sanchez-Ferrer, A., Garcia-Carmona, F. 2006. Kinetic model of apple juice enzymatic browning in the presence of cyclodextrins: the use of maltosyl- β -cyclodextrin as secondary antioxidant. *Food Chem.* 101(3), 1164–1171.
- Lopez-Nicolas, J.M., Perez-Lopez, A.J., Carbonell-Barrachina, A., Garcia-Carmona, F. 2007. Use of natural and modified cyclodextrins as inhibiting agents of peach juice enzymatic browning. *J. Agr. Food Chem.* 55(13), 5312–5319.
- Lopez-Nicolas, J.M., Rodríguez-Bonilla, P., Garcia-Carmona, F. 2014. Cyclodextrins and antioxidants. *Crit. Rev. Food Sci.* 54(2), 251–276.
- Lucas-Abellan, C., Mercader-Ros, M.T., Zafrilla, M.P., Gabaldon, J.A., Nunez-Delicado, E. 2011. Comparative study of different methods to measure antioxidant activity of resveratrol in the presence of cyclodextrins. *Food Chem. Toxicol.* 49(6), 1255–1260.
- Lucera, A., Costa, C., Conte, A., Del Nobile, M.A. 2012. Food applications of natural antimicrobial compounds. *Front. Microbiol.* 3, article 287.
- Lucini, E.I., Zunino, M.P., Lopez, M.L., Zygodlo, J.A. 2006. Effect of monoterpenes on lipid composition and sclerotial development of *Sclerotium cepivorum* Berk. *J. Phytopathol.* 154(7-8), 441–446.
- Magro, A., Carolino, M., Bastos, M., Mexia, A. 2006. Efficacy of plant extracts against stored products fungi. *Rev. Iberoam. Micol.* 23(3), 176–178.
- Mali Snehal, D., Khochage Swapna, R., Nitalikar Manoj, M., Magdum Chandrakant, S. 2013. Microencapsulation: a review. *RJPT*, 6(9), 954–961.
- Marconi, G., Mayer, B. 1997. Conformational and circular dichroism studies on cyclodextrin inclusion complexes. *Pure Appl. Chem.* 69(4), 779–783.
- Marinelli, E., Orzali, L., Lotti, E., Riccioni, L. 2012. Activity of some essential oils against pathogenic seed borne fungi on legumes. *Asian J. Plant Pathol.* 6(3), 66–74.
- Marques, H.M.C. 2010. A review on cyclodextrin encapsulation of essential oils and volatiles. *Flav. Frag. J.* 25(5), 313–326.
- Marteau, C., Nardello-Rataj, V., Favier, D., Aubry, J.M. 2013. Dual role of phenols as fragrances and antioxidants: mechanism, kinetics and drastic solvent effect. *Flav. Fragr. J.* 28(1), 30–38.
- Martel, B., Morcellet, M., Ruffin, D., Vinet, F., Weltrowski, M. 2002. Capture and controlled release of fragrances by CD finished textiles. *J. Inclusion Phenom.* 44(1-4), 439–442.
- Martina, K., Binello, A., Lawson, D., Jicsinszky, L., Cravotto, G. 2013. Recent applications of cyclodextrins as food additives and in food processing. *Curr. Nutr. Food Sci.* 9(3), 167–179.
- Martins, I.M., Barreiro, M.F., Coelho, M., Rodrigues, A.E. 2014. Microencapsulation of essential oils with biodegradable polymeric carriers for cosmetic applications. *Chem. Eng. J.* 245, 191–200.
- Mastelic, J., Jerkovic, I., Blazevic, I., Poljak-Blazi, M., Borovic, S., Ivancic-Bace, I., Smrecki, V., Zarkovic, N., Brcic-Kostic, K., Vikić-Yopić, D., Müller, N. 2008. Comparative study on the antioxidant and biological activities of carvacrol, thymol, and eugenol derivatives. *J. Agric. Food Chem.* 56(11), 3989–3996.
- Maswal, M., Dar, A.A. 2014. Formulation challenges in encapsulation and delivery of citral for improved food quality. *Food Hydrocolloid.* 37, 182–195.
- Maury, S., Geoffroy, P., Legrand, M. 1999. Tobacco O-methyltransferases involved in phenylpropanoid metabolism. The different caffeoyl-coenzyme A/5-hydroxyferuloyl-coenzyme A 3/5-O-

- methyltransferase and caffeic acid/5-hydroxyferulic acid 3/5-O-methyltransferase classes have distinct substrate specificities and expression patterns. *Plant Physiol.* 121(1), 215–223.
- Mazzobre, M.F., Dos Santos, C.I., Buera, M. 2011. Solubility and stability of β -cyclodextrin-terpineol inclusion complex as affected by water. *Food Biophys.* 6(2), 274–280.
- Mcgraw, G.W., Hemingway, R.W., Ingram Jr., L.L., Canady, C.S., Mcgraw, W.B. 1999. Thermal degradation of terpenes: camphene, Δ^3 -carene, limonene, and α -terpinene. *Environ. Sci. Technol.* 33(22), 4029–4033.
- Menezes, P.P., Serafini, M.R., Quintans-Junior, L.J., Silva, G.F., Oliveira, J.F., Carvalho, F.M.S., Souza, J.C.C., Matos, I.L., Alves, P.B., Matos, I.L., Hadaruga, D.I., Arujo, A.A.S. 2014. Inclusion complex of (-)-linalool and β -cyclodextrin. *J. Therm. Anal. Calorim.* 115(3), 2429–2437.
- Menezes, P.P., Serafini, M.R., Santana, B.V., Nunes, R.S., Quintans Jr., L.J., Silva, G.F., Medeiros, I.A., Marchioro, M., Fraga B.P., Santos, M.R.V., Araujo, A.A.S. 2012. Solid-state β -cyclodextrin complexes containing geraniol. *Thermochim. Acta.* 548, 45–50.
- Mercader-Ros, M.T., Lucas-Abellan, C., Fortea, M.I., Gabaldon, J.A., Nunez-Delicado, E. 2010. Effect of HP- β -cyclodextrins complexation on the antioxidant activity of flavonols. *Food Chem.* 118(3), 769–773.
- Merchan Arenas, D.R., Acevedo, A.M., Vargas Mendez, L.Y., Kouznetsov, V.V. 2011. Scavenger activity evaluation of the clove bud essential oil (*Eugenia caryophyllus*) and eugenol derivatives employing ABTS^{••} decolorization. *Sci. Pharm.* 79(4), 779–791.
- Meyer, K., Kohler, A., Kauss, H. 1991. Biosynthesis of ferulic acid esters of plant cell wall polysaccharides in endomembranes from parsley cells. *FEBS Lett.* 290(1-2), 209–212.
- Michielse, C.B., Rep, M. 2009. Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. *Mol. Plant Pathol.* 10(3), 311–324.
- Miguel, M.G. 2010. Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: a short review. *Molecules.* 15(12), 9252–9287.
- Misharina, T.A., Polshkov, A.N. 2005. Antioxidant properties of essential oils: autoxidation of essential oils from laurel and fennel and of their mixtures with essential oil from coriander. *Appl. Biochem. Microbio.* 41(6), 610–618.
- Miyazawa, I., Ueda, H., Nagase, H., Endo, T., Kobayashi, S., Nagai, T. 1995. Physicochemical properties and inclusion complex formation of δ -cyclodextrin. *Eur. J. Pharm. Sci.* 3(3), 153–162.
- Mocanu, G., Vizitiu, D., Carpov, A. 2001. Cyclodextrin polymers. *J. Bioact. Compat. Pol.* 16(4), 315–342.
- Moeder, C., O'Brien, T., Thompson, R., Bicker, G. 1996. Determination of stoichiometric coefficients and apparent formation constants for α - and β -CD complexes of terpenes using reversed-phase liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.* 736(1-2), 1–9.
- Mohit, V., Harshal, G., Neha, D., Vilasrao, K., Rajashree, H. 2011. A comparative study of complexation methods for cefdinir-hydroxypropyl- β -cyclodextrin system. *J. Incl. Phenom. Macro.* 71(1-2), 57–66.
- Moon, T.W., Ji, W.L., Jhee, K.H., Khang, K.W., Jeong, H.S., Yang, S.A., Kim, H.J. 2008. Supramolecular encapsulation of pulegone from oriental herb, *Schizonepeta tenuifolia* Briquet by β - and γ -cyclodextrins. *B. Kor. Chem. Soc.* 29(8), 1579–1582.
- Moore-Landecker, E. 2001. Fungal spores. In eLS. John Wiley & Sons, Ltd.
- Morin-Crini, N., Crini, G. 2013. Environmental applications of water-insoluble β -cyclodextrin-epichlorohydrin polymers. *Prog. Polym. Sci.* 38(2), 344–368.
- Mourtzinou, I., Kalogeropoulos, N., Papadakis, S.E., Konstantinou, K., Karathanos, V.T. 2008. Encapsulation of nutraceutical monoterpenes in β -cyclodextrin and modified starch. *J. Food Sci.* 73(1), S89–S94.
- Munin, A., Edwards-Lévy, F. 2011. Encapsulation of natural polyphenolic compounds; a review. *Pharmaceutics.* 3(4), 793–829.
- Mura, P. 2014. Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in aqueous solution: a review. *J. Pharmaceut. Biomed.* (in press).

- Murbach Teles Andrade, B.F., Nunes Barbosa, L., Da Silva Probst, I., Fernandes Jr., A. 2014. Antimicrobial activity of essential oils. *J. Essent. Oil Res.* 26(1), 34–40.
- Nair, D.V.T., Nannapaneni, R., Kiess, A., Schilling, W., Sharma, C.S. 2014. Reduction of salmonella on turkey breast cutlets by plant-derived compounds. *Foodborne Pathog. Dis.* 11(12), 981–987.
- Nakajima, M., Akutsu, K. 2014. Virulence factors of *Botrytis cinerea*. *J. Gen. Plant Pathol.* 80(1), 15–23.
- Nakanishi, K., Nadai, T., Masada, M., Miyajima, K. 1992. Effect of cyclodextrins on biological membrane. II. Mechanism of enhancement on the intestinal absorption of non-absorbable drug by cyclodextrins. *Chem. Pharm. Bull.* 40(5), 1252–1256.
- Narang, A.S., Desai, D., Badaw, S. 2012. Impact of excipient interactions on solid dosage form stability. *Pharmaceut. Res.* 29(10), 2660–2683.
- Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R., De Feo, V. 2013. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals.* 6(12), 1451–1474.
- Negi, P.S. 2012. Plant extracts for the control of bacterial growth: efficacy, stability and safety issues for food application. *Int. J. Food Microbiol.* 156(1), 7–17.
- Nenadis, N., Lazaridou, O., Tsimidou, M.Z. 2007. Use of reference compounds in antioxidant activity assessment. *J. Agr. Food Chem.* 55(14), 5452–5460.
- Nenadis, N., Wang, L.F., Tsimidou, M., Zhang, H.Y. 2004. Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the ABTS .+ assay. *J. Agr. Food Chem.* 52(15), 4669–4674.
- Nguyen, H., Campi, E.M., Roy Jackson, W., Patti, A.F. 2009. Effect of oxidative deterioration on flavour and aroma components of lemon oil. *Food Chem.* 112(2), 388–393.
- Nicolescu, C., Arama, C., Monciu, C.M. 2010. Preparation and characterization of inclusion complexes between repaglinide and β -cyclodextrin, 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin and randomly methylated β -cyclodextrin. *Farmacia.* 58(1), 78–88.
- Nieddu, M., Rassu, G., Boatto, G., Bosi, P., Trevisi, P., Giunchedi, P., Carta, A., Gavini, E. 2014. Improvement of thymol properties by complexation with cyclodextrins: *in vitro* and *in vivo* studies. *Carbohydr. Polym.* 102(1), 393–399.
- Nucci, M., Anaissie, E. 2007. Fusarium infections in immunocompromised patients. *Clin. Microbiol. Rev.* 20(4), 695–704.
- Nuchuchua, O., Saesoo, S., Sramala, I., Puttipipatkachorn, S., Sootitawat, A., Ruktanonchai, U. 2009. Physicochemical investigation and molecular modeling of cyclodextrin complexation mechanism with rugenol. *Food Res. Int.* 42(8), 1178–1185.
- Numanoglu, U., Sen, T., Tarimci, N., Kartal, M., Koo, O.M.Y., Onyuksel, H. 2007. Use of cyclodextrins as a cosmetic delivery system for fragrance materials: linalool and benzyl acetate. *AAPS PharmSciTech.* 8(4), article 85.
- Nunez-Delicado, E., Sanchez-Ferrer, A., Garcia-Carmona, F. 1997. Cyclodextrins as secondary antioxidants: synergism with ascorbic acid. *J. Agr. Food Chem.* 45(8), 2830–2835.
- Ohtani, Y., Irie, T., Uekama, K., Fukunaga, K., Pitha, J. 1989. Differential effects of α -, β - and γ -cyclodextrins on human erythrocytes. *Eur. J. Biochem.* 186(1-2), 17–22.
- Olszewska, M.A., Presler, A., Michel, P. 2012. Profiling of phenolic compounds and antioxidant activity of dry extracts from the selected sorbus species. *Molecules.* 17(3), 3093–3113.
- Omidbeygi, M., Barzegar, M., Hamidi, Z., Naghdibadi, H. 2007. Antifungal activity of thyme, summer savory and clove essential oils against *Aspergillus flavus* in liquid medium and tomato paste. *Food Control.* 18(12), 1518–1523.
- Otero-Pazos, P., Rodríguez-Bernaldo de Quirós, A., Sendón, R., Benito-Peña, E., González-Vallejo, V., Moreno-Bondi, M.C., Angulo, I., Paseiro-Losada, P. 2014. Active food packaging based on molecularly imprinted polymers: study of the release kinetics of ferulic acid. *J. Agr. Food Chem.* 62(46), 11215–11221.
- Pagington, J.S. 1987. β -Cyclodextrin: the success of molecular inclusion. *Chemistry in Britain.* 23(5), 455–458.

- Pajatsch, M., Andersen, C., Mathes, A., Böck, A., Benz, R., Engelhardt, H. 1999. Properties of a cyclodextrin-specific, unusual porin from *Klebsiella oxytoca*. *J. Biol. Chem.* 274(35), 25159–25166.
- Palhano, F.L., Vilches, T.T.B., Santos, R.B., Orlando, M.T.D., Ventura, J.A., Fernandes, P.M.B. 2004. Inactivation of *Colletotrichum gloeosporioides* spores by high hydrostatic pressure combined with citral or lemongrass essential oil. *Int. J. Food Microbiol.* 95(1), 61–66.
- Pandey, M., Debnath, M., Gupta, S., Chikara, S.K. 2011. Phytomedicine: an ancient approach turning into future potential source of therapeutics. *J. Pharmacognosy Phytother.* 3(2), 27–37.
- Park, B.S., Kang, H.K., Jang, A. 2005. Influence of feeding β -cyclodextrin to laying hens on the egg production and cholesterol content of egg yolk. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* 18(6), 835–840.
- Partanen, R., Ahro, M., Hakala, M., Kallio, H., Forssell, P. 2002. Microencapsulation of caraway extract in β -cyclodextrin and modified starches. *Eur. Food Res. Technol.* 214(3), 242–247.
- Pazyar, N., Yaghoobi, R., Bagherani, N., Kazerouni, A. 2013. A review of applications of tea tree oil in dermatology. *Int. J. Dermatol.* 52(7), 784–790.
- Pedersen, C.J. 1988. The discovery of crown ethers. *Science.* 241(4865), 536–540.
- São Pedro, A., Espirito Santo, I., Silva, C.V., Detoni, C., Albuquerque, E. 2013. Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education (A. Méndez-Vilas, Ed.)
- Peist, R., Schneider-Fresenius, C., Boos, W. 1996. The malT-dependent and malZ-encoded maltodextrin glucosidase of *Escherichia coli* can be converted into a dextrinyltransferase by a single mutation. *J. Biol. Chem.* 271(18), 10681–10689.
- Penalver, P., Huerta, B., Borge, C., Astorga, R., Romero, R., Perea, A. 2005. Antimicrobial activity of five essential oils against origin strains of the enterobacteriaceae family. *APMIS.* 113(1), 1–6.
- Pereira, K.L., Hamilton, J.F., Rickard, A.R., Bloss, W.J., Alam, M.S., Camredon, M., Munoz, A., Vazquez, M., Borrás, E., Rodenas, M. 2014. Secondary organic aerosol formation and composition from the photo-oxidation of methyl chavicol (estragole). *Atmos. Chem. Phys.* 14(11), 5349–5368.
- Pesavento, G., Calonico, C., Bilia, A.R., Barnabei, M., Calesini, F., Addona, R., Mencarelli, L., Carmagnini, L., Di Martino, M.C., Lo Nostro, A. 2015. Antibacterial activity of oregano, rosmarinus and thymus essential oils against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in beef meatballs. *Food Control.* 54, 188–199.
- Piel, G., Moutard, S., Perly, B., Henry De Hassonville, S., Bertholet, P., Barillaro, V., Piette, M., Delattre, L., Evrard, B. 2004. Comparison of two methods currently used to determine the interaction between cyclodextrins and drugs: phase solubility diagrams and NMR spectroscopy. *J. Drug Deliv. Sci. Tec.* 14(1), 87–91.
- Pinho, E., Grootveld, M., Soares, G., Henriques, M. 2014. Cyclodextrins as encapsulation agents for plant bioactive compounds. *Carbohydr. Polym.* 101(1), 121–135.
- Pinto, L.M.A., De Jesus, M.B., De Paula, E., Lino, A.C.S., Alderete, J.B., Duarte, H.A., Takahata, Y. 2004. Elucidation of inclusion compounds between β -cyclodextrin/local anaesthetics structure: a theoretical and experimental study using differential scanning calorimetry and molecular mechanics. *J. Mol. Struc-Theochem.* 678(1-3), 63–66.
- Pirna, A., Floare, C.G., Bogdan, M. 2014. The complexation of flurbiprofen with β -cyclodextrin: a NMR study in aqueous solution. *J. Incl. Phenom. Macro.* 78(1-4), 113–120.
- Pisseri, F., Bertoli, A., Pistelli, L. 2008. Essential oils in medicine: principles of therapy. *Parassitologia.* 50(1-2), 89–91.
- Pitha, J., Irie, T., Sklar, P.B., Nye, J.S. 1988. Drug solubilizers to aid pharmacologists: amorphous cyclodextrin derivatives. *Life Sci.* 43(6), 493–502.
- Ponce Cevallos, P.A., Buera, M.P., Elizalde, B.E. 2010. Encapsulation of cinnamon and thyme essential oils components (cinnamaldehyde and thymol) in β -cyclodextrin: effect of interactions with water on complex stability. *J. Food Eng.* 99(1), 70–75.
- Prior, R.L., Wu, X., Schaich, K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agr. Food Chem.* 53(10), 4290–4302.

- Qu, Q., Tucker, E., Christian, S.D. 2003. Solubilization of synthetic perfumes by nonionic surfactants and by sulfoalkyl ether β -CDs. *J. Inclusion Phenom.* 45(1-2), 83–89.
- Quidde, T., Osbourn, A.E., Tudzynski, P. 1998. Detoxification of α -tomatine by *Botrytis cinerea*. *Physiol. Mol. Plant P.* 52(3), 151–165.
- Quintans-Junior, L.J., Barreto, R.S.S., Menezes, P.P., Almeida, J.R.G.S., Viana, A.F.S.C., Oliveira, R.C.M., Oliveira, A.P., Gelain, D.P., de Lucca Junior, W., Araujo, A.A.S. 2013. β -Cyclodextrin-complexed (-)-linalool produces antinociceptive effect superior to that of (-)-linalool in experimental pain protocols. *Bas. Clin. Pharmacol. Toxicol.* 113(3), 167–172.
- Quiroga, E.N., Sampietro, A.R., Vattuone, M.A. 2001. Screening antifungal activities of selected medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* 74, 89–96.
- Rajewski, R.A., Stella, V.J. 1996. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 2. *In vivo* drug delivery. *J. Pharm. Sci.* 85(11), 1142–1169.
- Ramachandran, S., Fontanille, P., Pandey, A., Larroche, C. 2008. Permeabilization and inhibition of the germination of spores of *Aspergillus niger* for gluconic acid production from glucose. *Bioresource Technol.* 99(11), 4559–4565.
- Rao, A., Zhang, Y., Muend, S., Rao, R. 2010. Mechanism of antifungal activity of terpenoid phenols resembles calcium stress and inhibition of the TOR pathway. *Antimicrob. Agents Ch.* 54(12), 5062–5069.
- Rao, V.M., Stella, V.J. 2003. When can cyclodextrins be considered for solubilization purposes?. *J. Pharm. Sci.* 92(5), 927–932.
- Ravishankar, D., Rajora, A.K., Greco, F., Osborn, H.M.I. 2013. Flavonoids as prospective compounds for anti-cancer therapy. *Int. J. Biochem. Cell B.* 45(12), 2821–2831.
- Razzaghi-Abyaneh, M., Shams-Ghahfarokhi, M., Kawachi, M., Eslamifar, A., Schmidt, O.J., Schmidt, A., Allameh, A., Yoshinari, T. 2006. Ultrastructural evidences of growth inhibitory effects of a novel biocide, Akacid®plus, on an aflatoxigenic *Aspergillus parasiticus*. *Toxicon.* 48(8), 1075–1082.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical decolorization assay. *Free Radical Bio. Med.* 26(9-10), 1231–1237.
- Reddy, D.V., Krishna, N. 2009. Precision animal nutrition: a tool for economic and eco-friendly animal production in ruminants. *Livest. Res. Rural Dev.* 21 (3).
- Regnier, T., Combrinck, S., Plooy, W.D., Botha, B. 2010. Evaluation of *Lippia scaberrima* essential oil and some pure terpenoid constituents as postharvest mycobiocides for avocado fruit. *Postharvest Biol. Tec.* 57(3), 176–182.
- Reineccius, T.A., Reineccius, G.A., Peppard, T.L. 2002. Encapsulation of flavors using cyclodextrins: comparison of flavor retention in alpha, beta, and gamma types. *J. Food Sci.* 67(9), 3271–3279.
- Ribeiro, L., Carvalho, R.A., Ferreira, D.C., Veiga, F.J.B. 2005. Multicomponent complex formation between vinpocetine, cyclodextrins, tartaric acid and water-soluble polymers monitored by NMR and solubility studies. *Eur. J. Pharm. Sci.* 24(1), 1–13.
- Ribera, A.E., Zuniga, G. 2012. Induced plant secondary metabolites for phytopathogenic fungi control: a review. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 12 (4).
- Ritter, A.M.V., Domiciano, T.P., Verri Jr., W.A., Zarpelon, A.C., Da Silva, L.G., Barbosa, C.P., Natali, M.R.M., Cuman, R.K.N., Bersani-Amado, C.A. 2013. Antihypernociceptive activity of anethole in experimental inflammatory pain. *Inflammopharmacology.* 21(2), 187–197.
- Rivis, A., Hadaruga, N.G., Hadaruga, D.I., Trasca, T., Druga, M., Pinzaru, I. 2008. Bioactive nanoparticles: the complexation of odorant compounds with α - and β -cyclodextrin. *Rev. Chim.* 59(2), 149–153.
- Rodriguez, A., Perestelo, F., Carnicero, A., Regalado, V., Perez, R., De La Fuente, G., Falcon, M.A. 1996. Degradation of natural lignins and lignocellulosic substrates by soil-inhabiting fungi imperfecti. *FEMS Microbiol. Ecol.* 21(3), 213–219.

- Rozza, A.L., Pellizzon, C.H. 2013. Essential oils from medicinal and aromatic plants: a review of the gastroprotective and ulcer-healing activities. *Fund. Clin. Pharm.* 27(1), 51–63.
- Ruiz-Rubio, M., Perez-Espinosa, A., Lairini, K., Roldan-Arjona, T., Dipietro, A., Anaya, N. 2001. Metabolism of the tomato saponin α -tomatine by phytopathogenic fungi. *Stud. Nat. Prod. Chem.* 25, 293–326.
- Saad, N.Y., Muller, C.D., Lobstein, A. 2013. Major bioactivities and mechanism of action of essential oils and their components. *Flavour Frag. J.* 28(5), 269–279.
- Salustio, P.J., Pontes, P., Conduto, C., Sanches, I., Carvalho, C., Arrais, J., Marques, H.M.C. 2011. Advanced technologies for oral controlled release: cyclodextrins for oral controlled release. *AAPS PharmSciTech.* 12(4), 1276–1292.
- Sanchez, M.E., Turina, A.D.V., Garcia, D.A., Nolan, M.V., Perillo, M.A. 2004. Surface activity of thymol: implications for an eventual pharmacological activity. *Colloid. and Surfaces B.* 34(2), 77–86.
- Santhakumar, A.B., Bulmer, A.C., Singh, I. 2014. A review of the mechanisms and effectiveness of dietary polyphenols in reducing oxidative stress and thrombotic risk. *J. Hum. Nutr. Diet.* 27(1), 1–21.
- Santos, E.H., Kamimura, J.A., Hill, L.E., Gomes, C.L. 2015. Characterization of carvacrol beta-cyclodextrin inclusion complexes as delivery systems for antibacterial and antioxidant applications. *LWT-Food Sci. Technol.* 60(1), 583–592.
- Santoyo, S., Cavero, S., Jaime, L., Ibanez, E., Senorans, F.J., Reglero, G. 2006. Supercritical carbon dioxide extraction of compounds with antimicrobial activity from *Origanum vulgare* L.: determination of optimal extraction parameters. *J. Food Protect.* 69(2), 369–375.
- Santoyo, S., Jaime, L., García-Risco, M.R., Ruiz-Rodríguez, A., Reglero, G. 2014. Antiviral properties of supercritical CO₂ extracts from oregano and sage. *Int. J. Food Prop.* 17(5), 1150–1161.
- Saxena, G., Kalra, S.S., Gupta, N. 2011. Antimicrobial activity pattern of certain terpenoids. *Int. J. Pharm. Bio Sci.* 2(1), 87–91.
- Schardinger, F. 1903. Über Thermophile Bakterien aus verschiedenen Speisen und Milch, sowie über einige Umsetzungsprodukte derselben in kohlenhydrathaltigen Nahrlosungen, darunter krystallisierte Polysaccharide (Dextrine) aus Stärke. *Z. Untersuch. Nahr. u. Genussm.* 6, 865–880.
- Schardinger, F. 1911. Bildung kristallisierter polysaccharide (Dextrine) aus Starkekleister durch Microben. *Zentralbl. Bakteriол. Parasitenk. Abt. II* 29, 188–197.
- Schmid, G. 1989. Cyclodextrin glycosyltransferase production: yield enhancement by overexpression of cloned genes. *Trends Biotechnol.* 7(9), 244–248.
- Schmidt, B.V.K.J., Hetzer, M., Ritter, H., Barner-Kowollik, C. 2014. Complex macromolecular architecture design via cyclodextrin host/guest complexes. *Prog. Polym. Sci.* 39(1), 235–249.
- Schneider, E., Freundlieb, S., Tapio, S., Boos, W. 1992. Molecular characterization of the MalT-dependent periplasmic alpha-amylase of *Escherichia coli* encoded by malS. *J. Biol. Chem.* 267(8), 5148–5154.
- Schonbeck, C., Westh, P., Madsen, J.C., Larsen, K.L., Stade, L.W., Holm, R. 2010. Hydroxypropyl-substituted β -cyclodextrins: influence of degree of substitution on the thermodynamics of complexation with tauroconjugated and glycoconjugated bile salts. *Langmuir.* 26(23), 17949–17957.
- Schonbeck, C., Westh, P., Madsen, J.C., Larsen, K.L., Stade, L.W., Holm, R. 2011. Methylated β -cyclodextrins: influence of degree and pattern of substitution on the thermodynamics of complexation with tauro- and glyco-conjugated bile salts. *Langmuir.* 27(10), 5832–5841.
- Schumacher, J., Tudzynski, P. 2012. Morphogenesis and infection in *Botrytis cinerea*. *Top. Curr. Genet.* 22, 225–241.
- Seo, E.J., Min, S.G., Choi, M.J. 2010. Release characteristics of freeze-dried eugenol encapsulated with β -cyclodextrin by molecular inclusion method. *J. Microencapsul.* 27(6), 496–505.
- Seow, Y.X., Yeo, C.R., Chung, H.L., Yuk, H.G. 2014. Plant essential oils as active antimicrobial agents. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 54(5), 625–644.

- Serafini, M.R., Menezes, P.P., Costa, L.P., Lima, C.M., Quintans Jr, L.J., Cardoso, J.C., Matos, J.R., Soares-Sobrinho, J.L., Grangeiro Jr, S., Nunes, P.S., Bonjadim, L.R., Araújo, A.A.S. 2012. Interaction of *p*-cymene with β -Cyclodextrin. *J. Therm. Anal. Calorim.* 109 (2), 951–955.
- Shah, B., Davidson, P.M., Zhong, Q. 2012. Nanocapsular dispersion of thymol for enhanced dispersibility and increased antimicrobial effectiveness against *Escherichia coli* O157: H7 and *Listeria monocytogenes* in model food systems. *Appl. Environ. Microb.* 78(23), 8448–8453.
- Shahat, A.A., Ibrahim, A.Y., Hendawy, S.F., Omer, E.A., Hammouda, F.M., Abdel-Rahman, F.H., Saleh, M.A. 2011. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of essential oils from organically cultivated fennel cultivars. *Molecules.* 16(2), 1366–1377.
- Sherry, M., Charcosset, C., Fessi, H., Greige-Gerges, H. 2013. Essential oils encapsulated in liposomes: a review. *J. Liposome Res.* 23(4), 268–275.
- Shi, J.-H., Ye, Y. 2010. Separation of enantiomers of sec-butyl carboxylates on β -cyclodextrin derivatives and chiral recognition mechanism. *Chinese J. Anal. Chem.* 38(10), 1450–1456.
- Si, W., Gong, J., Tsao, R., Zhou, T., Yu, H., Poppe, C., Johnson, R., Du, Z. 2006. Antimicrobial activity of essential oils and structurally related synthetic food additives towards selected pathogenic and beneficial gut bacteria. *J. Appl. Microbiol.* 100(2), 296–305.
- Singh, A., Sharma, P.K., Garg, G. 2010. Natural products as preservatives. *Int. J. Pharm. Biol. Sci.* 1(4) article 68.
- Sivak, J.G., Herbert, K.L., Segal, L. 1994. Ocular lens organ culture as a measure of ocular irritancy: the effect of surfactants. *Toxicol. Mech. Method.* 4(1), 56–65.
- Smith, R.L., Cohen, S.M., Doull, J., Feron, V.J., Goodman, J.I., Marnett, L.J., Portoghese, P.S., Waddell, W.J., Wagner, B.M., Adams, T.B. 2005. GRAS flavoring substances 22. *Food Technol.* 59(8), 24–62.
- Sofos, J.N., Beuchat, L.R., Davidson, P.M., Johnson, E.A. 1998. Naturally occurring antimicrobials in food. *Regulat. Toxicol. Pharm.* 28(2), 71–72.
- Solanki, J., Daslaniya, D., Patel, G., Bhimani, B., Patel, U., Kamani, D. 2013. Liquisolid compacts: a novel approach to enhance the dissolution. *RJPT.* 6(3), 313–320.
- Solomon, S., Qin, D., Manning, M., Chen, Z., Marquis, M., Averyt, K., Tignor, M., Miller, H. 2007. Climate change-2007: the physical science basis: working group I contribution to the fourth assessment report of the IPCC, Cambridge University Press, Cambridge, 2007.
- Song, K.M., Shim, J.H., Park, J.T., Kim, S.H., Kim, Y.W., Boos, W., Park, K.H. 2010. Transglycosylation properties of maltodextrin glucosidase (MalZ) from *Escherichia coli* and its application for synthesis of a nigerose-containing oligosaccharide. *Biochem. Bioph. Res. Co.* 397(1), 87–92.
- Staples, C.A. 2000. A screening level examination of the potential risks of acetone in aquatic and terrestrial environments using multi-media modeling. *Chemosphere.* 41(10), 1529–1533.
- Staudinger, J., Roberts, P.V. 2001. A critical compilation of Henry's law constant temperature dependence relations for organic compounds in dilute aqueous solutions. *Chemosphere.* 44(4), 561–76.
- Steel, C.C., Greer, L.A., Savocchia, S., Samuelian, S.K. 2011. Effect of temperature on *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum acutatum* and *Greeneria uvicola* mixed fungal infection of *Vitis vinifera* grape berries. *Vitis.* 50(2), 69–71.
- Stella, V.J., He, Q. 2008. Cyclodextrins. *Toxicol. Pathol.* 36(1), 30–42.
- Stella, V.J., Rao, V.M., Zannou, E.A., Zia, V. 1999. Mechanisms of drug release from cyclodextrin complexes. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 36(1), 3–16.
- Stražičar, M., Andrenšek, S., Šmidovnik, A. 2008. Effect of β -cyclodextrin on antioxidant activity of coumaric acids. *Food Chem.* 110(3), 636–642.
- Su, J.Y., Chen, J.P., Chen, L., Li, L., Zhu, L., Xu, Z.B. 2012. Effect of hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion on characteristics of d-borneol. *J. South China Univ. Technol.* 40(8), 122–127.
- Suhr, K.I., Nielsen, P.V. 2003. Antifungal activity of essential oils evaluated by two different application techniques against rye bread spoilage fungi. *J. Appl. Microbiol.* 94(4), 665–674.

- Sui, H., Gao, F., Cao, X., Li, X. 2013. Remediation of PAHs and heavy metals in co-contaminated sites with cyclodextrin. *Fresen. Environ. Bull.* 22(5), 1452–1457.
- Sun, M.M., Teng, Y., Luo, Y.M., Li, Z.G., Jia, Z.J., Zhang, M.Y. 2013. Ex-situ remediation of PAHs contaminated site by successive methyl- β -cyclodextrin enhanced soil washing. *Environm. Sci.* 34(6), 2428–2435.
- Suta, L.M., Vlaia, L., Fulas, A., Ledeti, I., Hadaruga, D., Mircioiu, C. 2013. Evaluation study of the inclusion complexes of some oxicams with 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Rev. Chim.* 64(11), 1279–1283.
- Swarupa, V., Ravishankar, K.V., Rekha, A. 2014. Plant defense response against *Fusarium oxysporum* and strategies to develop tolerant genotypes in banana. *Planta.* 239(4), 735–751.
- Szejtli, J. 1988. Cyclodextrin technology. Springer Science & Business Media, 450 pages.
- Szejtli, J. 1990. The cyclodextrins and their applications in biotechnology. *Carbohydr. Polym.* 12(4), 375–392.
- Szejtli, J. 1997. Utilization of cyclodextrins in industrial products and processes. *J. Mater. Chem.* 7(4), 575–587.
- Szejtli, J. 2004. Past, present, and future of cyclodextrin research. *Pure Appl. Chem.* 76(10), 1825–1845.
- Szejtli, J., Bolla Pusztai, E., Kajtar, M. 1982. The β -cyclodextrin inclusion complex of menadione (vitamin K3). *Pharmazie.* 37(10), 725–728.
- Szejtli, J., Szente, L. 1979. Stabilization of volatile, oxidizable flavour substances by β cyclodextrin. *Planta Med.* 36(3), 292–293.
- Szejtli, J., Szente, L. 2005. Elimination of bitter, disgusting tastes of drugs and foods by cyclodextrins. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 61(3), 115–125.
- Szente, L., Szejtli, J. 1999. Highly soluble cyclodextrin derivatives: chemistry, properties, and trends in development. *Adv. Drug Deliver. Rev.* 36(1), 17–28.
- Szente, L., Szejtli, J. 2004. Cyclodextrins as food ingredients. *Trends Food Sci. Technol.* 15(3-4), 137–142.
- Szente, L., Szeman, H. 2013. Cyclodextrins in analytical chemistry: host-guest type molecular recognition. *Anal. Chem.* 85(17), 8024–8030.
- Taavoni, S., Darsareh, F., Joolaei, S., Haghani, H. 2013. The effect of aromatherapy massage on the psychological symptoms of postmenopausal Iranian women. *Complement. Ther. Med.* 21(3), 158–163.
- Tajkarimi, M.M., Ibrahim, S.A., Cliver, D.O. 2010. Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control.* 21(9), 1199–1218.
- Takahashi, A.I., Veiga, F.J.B., Ferraz, H.G. 2012. A literature review of cyclodextrin inclusion complexes characterization - Part III: differential scanning calorimetry and thermogravimetry. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* 12(1), 16–20.
- Talibi, I., Boubaker, H., Boudyach, E.H., Ait Ben Aoumar, A. 2014. Alternative methods for the control of postharvest citrus diseases. *J. Appl. Microbiol.* 117(1), 1–17.
- Tanemura, I., Saito, Y., Ueda, H., Sato, T. 1998. Solubility method using static head-space gas chromatography for determination of the stability constants of fragrance materials with 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Chem. Pharm. Bull.* 46(3), 540–541.
- Tangarife-Castano, V., Roa-Linares, V., Betancur-Galvis, L.A., Duran Garcia, D.C., Stashenko, E., Mesa-Arango, A.C. 2012. Antifungal activity of Verbenaceae and Labiatae families essential oils. *Pharmacologyonline.* 1(1), 133–145.
- Tao, F., Hill, L.E., Peng, Y., Gomes, C.L. 2014. Synthesis and characterization of β -cyclodextrin inclusion complexes of thymol and thyme oil for antimicrobial delivery applications. *LWT-Food Sci. Technol.* 59(1), 247–255.
- Taylor, A.J. 1998. Physical chemistry of flavour. *Int. J. Food Sci. Tech.* 33(1), 53–62.
- Teutsch, H.G., Hasenfratz, M.P., Lesot, A., Stoltz, C., Garnier, J.M., Jeltsch, J.M., Durst, F., Werck-Reichhart, D. 1993. Isolation and sequence of a cDNA encoding the Jerusalem artichoke cinnamate 4-

- hydroxylase, a major plant cytochrome P450 involved in the general phenylpropanoid pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 90(9), 4102–4106.
- Thoma, J. A., Stewart, L. 1965. Starch, chemistry and technology I, R. L. Whistler and E. F. Paschall (Eds.), p. 209, Academic Press, New York.
- Thompson, D.O. 1997. Cyclodextrins - enabling excipients: their present and future use in pharmaceuticals. *Crit. Rev. Ther. Drug*. 14(1), 1–104.
- Tokumura, T., Tsushima, Y., Kayano, M., Machida, Y., Nagai, T. 1985. Enhancement of bioavailability of cinnarizine from its β -cyclodextrin complex on oral administration with DL-phenylalanine as a competing agent. *J. Pharm. Sci.* 74(4), 496–497.
- Tominaga, H., Kobayashi, Y., Goto, T., Kasemura, K., Nomura, M. 2005. DPPH radical-scavenging effect of several phenylpropanoid compounds and their glycoside derivatives. *Yakugaku Zasshi*. 125(4), 371–375.
- Trasarti, A.F., Marchi, A.J., Apesteguia, C.R. 2013. Synthesis of menthols from citral on Ni/SiO₂-Al₂O₃ catalysts. *Catal. Commun.* 32, 62–66.
- Tuominen, L.K., Johnson, V.E., Tsai, C.J. 2011. Differential phylogenetic expansions in BAHD acyltransferases across five angiosperm taxa and evidence of divergent expression among populus paralogues. *BMC Genomics*. 12(1), 1–17.
- Turek, C., Stintzing, F.C. 2012. Impact of different storage conditions on the quality of selected essential oils. *Food Res. Int.* 46(1), 341–353.
- Turek, C., Stintzing, F.C. 2013. Stability of essential oils: a review. *Compr. Rev. Food Sci. F.* 12(1), 40–53.
- Tzortzakakis, N.G. 2009. Impact of cinnamon oil-enrichment on microbial spoilage of fresh produce. *Innov. Food Sci. Emerg.* 10(1), 97–102.
- Ulloth, J.E., Almaguel, F.G., Padilla, A., Bu, L., Liu, J.W., De Leon, M. 2007. Characterization of methyl- β -cyclodextrin toxicity in NGF-differentiated PC12 cell death. *NeuroToxicology*. 28(3), 613–621.
- Ultee, A., Bennis, M.H.J., Moezelaar, R., 2002. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(4), 1561–1568.
- Ultee, A., Kets, E.P.W., Smid, E.J. 1999. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen. *Appl. Environ. Microb.* 65(10), 4606–4610.
- Valgas, C., De Souza, S.M., Smânia, E.F.A., Smânia Jr., A. 2007. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. *Braz. J. Microbiol.* 38(2), 369–380.
- Valente, A.J.M., Söderman, O. 2014. The formation of host-guest complexes between surfactants and cyclodextrins. *Advances in Colloid and Interface Science*. 205, 156–76.
- Van Stam, J., De Feyter, S., De Schryver, F.C., Evans, C.H. 1996. 2-Naphthol complexation by β -cyclodextrin: influence of added short linear alcohols. *J. Phys. Chem.* 100(51), 19959–19966.
- Vandelli, M.A., Ruozzi, B., Forni, F., Mucci, A., Salvioli, G., Galli, E. 2000. A solution and solid state study on 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin complexation with hydoxycholic acid. *J. Inclusion Phenom.* 37(1-4), 237–251.
- Ververidis, F., Trantas, E., Douglas, C., Vollmer, G., Kretzschmar, G., Panopoulos, N. 2007. Biotechnology of flavonoids and other phenylpropanoid-derived natural products. Part I: chemical diversity, impacts on plant biology and human health. *Biotechnol. J.* 2(10), 1214–1234.
- Villiers, A. 1891. Sur la fermentation de la fécule par l'action du ferment butyrique. *Compt. Rend. Acad. Sci.* 112, 536–538.
- Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernandez-Lopez, J., Perez-Alvarez, J. 2008. Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils. *Food Control*. 19(12), 1130–1138.
- Von Mach, M.A., Burhenne, J., Weilemann, L.S. 2006. Accumulation of the solvent vehicle sulphobutylether beta cyclodextrin sodium in critically ill patients treated with intravenous voriconazole under renal replacement therapy. *BMC Clin. Pharmacol.* 6, Article 6.

- Waalkens-Berendsen, D.H., Bar, A. 2004. Embryotoxicity and teratogenicity study with α -cyclodextrin in rats. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 39, S34–S39.
- Wang, J., Cao, Y., Sun, B., Wang, C. 2011b. Characterisation of inclusion complex of *trans*-ferulic acid and hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Food Chem.* 124(3), 1069–1075.
- Wang, T., Li, B., Si, H., Lin, L., Chen, L. 2011a. Release characteristics and antibacterial activity of solid state eugenol/ β -cyclodextrin inclusion complex. *J. Incl. Phenom. Macro.* 71(1-2), 207–213.
- Wang, X., Brusseau, M.L. 1993. Solubilization of some low-polarity organic compounds by hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Environ. Sci. Technol.* 27(13), 2821–2825.
- Wang, X., Luo, Z., Xiao, Z. 2014. Preparation, characterization, and thermal stability of β -cyclodextrin/soybean lecithin inclusion complex. *Carbohydr. Polym.* 101(1), 1027–1032.
- Wang, X., Wu, F., Han, X. 2007. Effects of sugars on germination and mycelium growth of *Fusarium oxysporum*. *Allelopathy J.* 20(2), 339–346.
- Wang, Y., Zhou, S.L., Xia, J.R., Xue, J., Xu, J.H., Zhu, J.H. 2004. Trapping and degradation of volatile nitrosamines on cyclodextrin and zeolites. *Micropor. Mesopor. Mat.* 75(3), 247–254.
- Wannissorn, B., Jarikasem, S., Siriwangchai, T., Thubthimthed, S. 2005. Antibacterial properties of essential oils from Thai medicinal plants. *Fitoterapia.* 76(2), 233–236.
- Warrington, S. 1993. Effects of piroxicam-beta-cyclodextrin on the gastrointestinal tract. *Eur. J. Rheumatol. Infl.* 12(4), 29–37.
- Wells, J.E., Berry, E.D., Varel, V.H. 2005. Effects of common forage phenolic acids on *Escherichia coli* O157:H7 viability in bovine feces. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(12), 7974–7979.
- Wenz, G. 2009. Recognition of monomers and polymers by cyclodextrins. *Adv. Polym. Sci.* 222(1), 1–54.
- Williamson, B., Tudzynski, B., Tudzynski, P., Van Kan, J.A.L. 2007. *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Mol. Plant Pathol.* 8(5), 561–580.
- Winau, F., Westphal, O., Winau, R. 2004. Paul Ehrlich - In search of the magic bullet. *Microbes Infect.* 6(8), 786–789.
- Wintola, O.A., Afolayan, A.J. 2011. Phytochemical constituents and antioxidant activities of the whole leaf extract of *Aloe ferox* Mill. *Pharmacogn. Mag.* 7(28), 325–333.
- Wu, F. 2007. Measuring the economic impacts of *Fusarium* toxins in animal feeds. *Anim. Feed Sci. Tech.* 137(3-4), 363–374.
- Wu, J.S., Zheng, J.Z., Toda, K., Sanemasa, I. 1999. Association of alcohol-cyclodextrin in aqueous medium determined by headspace gas chromatography. *Anal. Sci.* 15(7), 701–703.
- Xing, Y., Li, X., Xu, Q., Yun, J., Lu, Y. 2010. Antifungal activities of cinnamon oil against *Rhizopus nigricans*, *Aspergillus flavus* and *Penicillium expansum* *in vitro* and *in vivo* fruit test. *Int. J. Food Sci. Tech.* 45(9), 1837–1842.
- Xu, M., Lill, M.A. 2013. Induced fit docking, and the use of QM/MM methods in docking. *Drug Discovery Today: Technologies.* 10(3), 411–418.
- Xu, N., Liu, M., Hong, S., Yan, W., Fu, J., Deng, W. 2014. Recent progress in gene delivery based on cyclodextrin. *Prog. Chem.* 26(2-3), 375–384.
- Yamamoto, C., Neoh, T.L., Honbou, H., Yoshii, H., Furuta, T. 2012. Kinetic analysis and evaluation of controlled release of d-limonene encapsulated in spray-dried cyclodextrin powder under linearly ramped humidity. *Dry. Technol.* 30(11-12), 1283–1291.
- Yameogo, J.B.G., Geze, A., Choisnard, L., Putaux, J.L., Semde, R., Wouessidjewe, D. 2014. Progress in developing amphiphilic cyclodextrin-based nanodevices for drug delivery. *Curr. Top. Med. Chem.* 14(4), 526–541.
- Yang, Y., Song, L.X. 2005. Study on the inclusion compounds of eugenol with α -, β -, γ - and heptakis (2,6-di-O-methyl)- β -cyclodextrins. *J. Inclusion Phenom.* 53(1-2), 27–33.
- Yeh, C.T., Yen, G.C. 2003. Effects of phenolic acids on human phenolsulfotransferases in relation to their antioxidant activity. *J. Agr. Food Chem.* 51(5), 1474–1479.

- Yin, J.J., Zhou, Z.W., Zhou, S.F. 2013. Cyclodextrin-based targeting strategies for tumor treatment. *Drug Deliv. Transl. Res.* 3(4), 364–374.
- Yossa, N., Patel, J., Millner, P., Ravishankar, S., Lo, Y.M. 2013. Antimicrobial activity of plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* on lettuce. *Foodborne Pathog. Dis.* 10(1), 87–96.
- Yu, S.C., Bochet, A., Le Bas, G., Cheron, M., Mahuteau, J., Grossiord, J.L., Seiller, M., Duchene, D. 2003. Effect of camphor/cyclodextrin complexation on the stability of O/W/O multiple emulsions. *Int. J. Pharm.* 261(1-2), 1–8.
- Yuan, C., Lu, Z., Jin, Z. 2014. Characterization of an inclusion complex of ethyl benzoate with hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Food Chem.* 152, 140–145.
- Yuk, H.G., Marshall, D.L. 2004. Adaptation of *Escherichia coli* O157:H7 to pH alters membrane lipid composition, verotoxin secretion, and resistance to simulated gastric fluid acid. *Appl. Environ. Microb.* 70(6), 3500–3505.
- Yurtdas, G., Demirel, M., Genc, L. 2011. Inclusion complexes of fluconazole with β -cyclodextrin: physicochemical characterization and *in vitro* evaluation of its formulation. *J. Incl. Phenom. Macro.* 70(3-4), 429–435.
- Zabka, M., Pavela, R. 2013. Antifungal efficacy of some natural phenolic compounds against significant pathogenic and toxinogenic filamentous fungi. *Chemosphere.* 93(6), 1051–1056.
- Zabka, M., Pavela, R., Slezakova, L. 2009. Antifungal effect of *Pimenta dioica* essential oil against dangerous pathogenic and toxinogenic fungi. *Ind. Crop. Prod.* 30(2), 250–253.
- Zhan, H., Jiang, Z.T., Wang, Y., Li, R., Dong, T.S. 2008. Molecular microcapsules and inclusion interactions of eugenol with β -cyclodextrin and its derivatives. *Eur. Food Res. Technol.* 227(5), 1507–1513.
- Zhang, L., Ouyang, X., Ni, L., Shi, W. 2014. Preparation and evaluation of microcapsule containing volatile oil of *Herba schizonepetae* by emulsion solvent diffusion method. *Transactions of Tianjin University.* 20(2), 103–111.
- Zhang, M., Li, J., Jia, W., Chao, J., Zhang, L. 2009b. Theoretical and experimental study of the inclusion complexes of ferulic acid with cyclodextrins. *Supramol. Chem.* 21(7), 597–602.
- Zhang, M., Li, J., Zhang, L., Chao, J. 2009a. Preparation and spectral investigation of inclusion complex of caffeic acid with hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Spectrochim. Acta A.* 71(5), 1891–1895.
- Zhao, M., Wang, H., Yang, B., Tao, H. 2010. Identification of cyclodextrin inclusion complex of chlorogenic acid and its antimicrobial activity. *Food Chem.* 120(4), 1138–1142.
- Zhao, W., Chao, J., Du, R., Huang, S. 2011. Spectroscopic studies on the inclusion behavior between caffeic acid and γ -cyclodextrin. *J. Incl. Phenom. Macro.* 71(1-2), 25–34.
- Zia, V., Rajewski, R.A., Stella, V.J. 2001. Effect of cyclodextrin charge on complexation of neutral and charged substrates: comparison of (SBE)7m- β -CD to HP- β -CD. *Pharm. Res.* 18(5), 667–673.
- Zuzarte, M., Gonçalves, M.J., Cavaleiro, C., Cruz, M.T., Benzarti, A., Marongiu, B., Maxia, A., Piras, A., Salgueiro, L. 2013. Antifungal and anti-inflammatory potential of *Lavandula stoechas* and *Thymus herba-barona* essential oils. *Ind. Crops Prod.* 44, 97–103.